Aus der Klinik
für Tiergeburtshilfe und Klauentierkrankheiten
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. J. Heidrich

---

# Konservierung von Ebersamen bei Kühlschranktemperaturen unter Verwendung mehrerer $CO_2$-gesättigter Verdünner

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt
von
Dirk Kohring
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1965

Journal-Nr.: 506

Aus der Klinik für Tiergeburtshilfe und Klauentierkrankheiten
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. J. H e i d r i c h

---

# Konservierung von Ebersamen bei Kühlschranktemperaturen unter Verwendung mehrerer $CO_2$ - gesättigter Verdünner.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dirk K o h r i n g
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1965
Journal-Nr. 506

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Prof. Dr. H. J. Heidrich
Korreferent: Prof. Dr. E. Becker

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Tag der Promotion: 23. 7. 1965

# Inhaltsverzeichnis


| | Seite |
|---|---|
| A. Einleitung | 1 |
| B. Literaturübersicht | 2 |
| I. $CO_2$-Inaktivierung | 2 |
| II. Verdünner für niedrige Temperaturen | 5 |
| III. Abkühlmethoden und Kühlgeschwindigkeiten | 8 |
| IV. Glycerin als Verdünnerzusatz | 11 |
| V. Reaktivierung des konservierten Ebersamens | 13 |
| C. Eigene Untersuchungen | 15 |
| I. Material und Methode | 15 |
| II. Versuchsergebnisse | 21 |
| 1. Spermauntersuchungen | 21 |
| 2. Vorversuche | 23 |
| 3. Hauptversuche | 29 |
| Konservierungsergebnisse | |
| a) Verdünner 1 | 29 |
| b) Verdünner 2 | 32 |
| c) Verdünner 3 | 38 |
| d) Verdünner 4 | 44 |
| D. Diskussion der Ergebnisse | 50 |
| E. Zusammenfassung | 54 |
| F. Literaturverzeichnis | 56 |

## A. EINLEITUNG

Die künstliche Schweinebesamung hat in den letzten 10 Jahren in vielen Ländern eine beachtliche Entwicklung erfahren. Trotz des Vorliegens recht zufriedenstellender Besamungserfolge mit kurzzeitig konserviertem Samen, wird überall an der weiteren Vervollkommnung der Ebersamenkonservierung gearbeitet. Die Aufrechterhaltung der Befruchtungsfähigkeit konservierten Ebersamens kann nach vorliegenden Literaturangaben trotz vieler Bemühungen mit den bis heute bekannten Methoden noch nicht den Anforderungen interessierter Kreise genügen.
Aus diesem Grund ist der Schweinebesamung bisher die praktische Anwendung in einem größeren Rahmen versagt geblieben.

Nach übereinstimmenden Berichten vieler Autoren ist als optimale Lagerungstemperatur für Ebersamenkonserven mit den heute gebräuchlichen Verdünnern der Temperaturbereich von + 12 bis + 18°C angegeben.
Sehr unterschiedlich sind die Erfolge bei Anwendung tieferer Konservierungstemperaturen. Bislang scheint für die Ebersamenkonservierung in diesem Temperaturbereich nicht der geeignete Verdünner gefunden zu sein. Deshalb wurde mir von Herrn Prof. Dr. Heidrich die Aufgabe übertragen, bei Kühlschranktemperaturen Ebersamenkonservierungen durchzuführen und einige $CO_2$ - gesättigte Verdünnungsmedien auf ihre Brauchbarkeit zu untersuchen.

## B. LITERATURÜBERSICHT

### I. $CO_2$ - Inaktivierung

Aus umfangreichen Untersuchungen über die Morphologie des Nebenhodens sowie über die Beschaffenheit der Nebenhodenspermien folgerte REDENZ (1924), daß für die Anabiose der Spermien das Fehlen von Sauerstoff sowie eine schwach saure Reaktion von Bedeutung seien. Er vermutete schon, daß die Kohlensäure maßgeblich daran beteiligt sei und neben einer säuernden und $O_2$ - verdrängenden auch eine narkotische Wirkung auf die Spermien entfalte. Diese Vermutungen wurden von KRZYSKOWSKY und PAWLOW (1927) bestätigt. Sie glaubten, daß die narkotisierende Wirkung des $CO_2$ auf die Spermien eine praktische Bedeutung für die Samenkonservierung außerhalb des tierischen Körpers besitzen könne.

Einen Fortschritt in der praktischen Anwendung des Kohlendioxyds bei der Samenkonservierung brachten die Untersuchungen von VANDEMARK und SHARMA (1957) sowie von VANDEMARK und COUTURIER (1956, 1958). Sie entwickelten den heute noch in der Bullen- und Eberspermakonservierung häufig verwendeten IVT - Verdünner, den sie mit $CO_2$ - Gas sättigten (VANDEMARK und SHARMA, 1957). Durch die $CO_2$ - Sättigung des Verdünners wurde eine reversible Hemmung des Spermastoffwechsels bewirkt, und sie konnten nach Austreibung des Kohlendioxyds aus der Samenverdünnung die vor Versuchsbeginn vorhandene glykolytische Aktivität der Spermien beobachten.

Diese in der Bullenspermakonservierung gemachten Erfahrungen fanden in F r a n k r e i c h erstmalig in der Eberspermakonservierung Verwendung (DU MESNIL DU BUISSON und DAUZIER, 1958, 1959; DU MESNIL DU BUISSON und JONDET, 1961). Nach 8-tägiger Lagerung der unter $CO_2$ - Bedingungen konservierten Eberejakulate bei + 15°C konnte noch ein Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien von 40% ermittelt werden. 1961 transportierten BEN JOSEPH und DU MESNIL DU BUISSON mit Kohlendioxyd konservierten Ebersamen auf schmelzender Essigsäure bei + 15°C im Flugzeug nach Israel und führten mit mehrere Tage altem Samen erfolgreiche Schweinebesamungen durch.

Aus R u ß l a n d wurde über die Konservierung von Ebersamen mittels Kohlendioxyd durch KVASNITZKI (1959), MILOWANOW und SOKOLOWSKAJA (1960) sowie ARCHIPOWETZ (1960, 1961 und 1962) berichtet. Im Gegensatz zur bisher üblichen $CO_2$ - Sättigung des Verdünners wurde von KVASNITZKI (1959) die Kohlendioxydsättigung frisch gewonnener und unverdünnter Ejakulate beschrieben. Eine Auffüllung der Samenkonserve erfolgte erst zum Zeitpunkt der Besamung.

In D e u t s c h l a n d wurde das $CO_2$ - Inaktivierungsverfahren erstmals von EIBL und Mitarbeitern (1959 a) in der Bullenspermakonservierung angewendet. Sie entwickelten ein Glasgerät für das Durchgasen schäumender Verdünner (EIBL und Mitarb., 1959 b).
In der Folgezeit wurde diese Konservierungsmethode auch von anderen Autoren für die Eberspermakonservierung angewendet.

LIESS und GROVE (1963) durchgasten bei in-vitro-Versuchen wie KVASNITZKI (1959) unverdünnte Ejakulate. SPREMBERG (1963), ROHLOFF (1964) und WETTKE und ROHLOFF (1964) konservierten Gesamtejakulate unter $CO_2$ - Bedingungen in mehreren salinischen und Milchverdünnern mit und ohne Zusätzen von Eidotter. SMIDT (1964), HEIDRICH und Mitarb. (1964) sowie v.PUSCH (1965) konnten bei Konservierungen der spermareichen Ejakulatsphasen in eidotterhaltigen $CO_2$ - gesättigten Verdünnern gute Konservierungsresultate erzielen.
EIBL und WETTKE (1964) führten Besamungen mit Ebersamen durch, der mit einem modifizierten, kohlendioxydgesättigten IVT - Verdünner bei + 15°C konserviert worden war. Der Befruchtungserfolg war mit 4 Tage alten Samenkonserven noch über 50%.
ROHLOFF und KOHRING (unveröffentlicht) untersuchten den Einfluß von Glycerin als Zusatz zu eidotterhaltigen und eidotterfreien $CO_2$ - gesättigten Magermilchverdünnern nach einer Lagerung der Samenampullen bei Kühlschranktemperaturen ( - 1° bis + 1°C). Eine Verbesserung der Konservierungsergebnisse konnte erzielt werden, wenn neben einem Glyceringehalt von 10% der Eidotteranteil des Verdünners 20% betrug.

## II. Verdünner für niedrige Temperaturen

Die große Menge und die Zusammensetzung des Eberejakulates erfordern eine große Sorgfalt bei seiner Verdünnung und Konservierung. Die praktischen Erfahrungen, die man bei der Konservierung von Ebersamen gemacht hatte, verlangen zunächst eine sorgfältige Abtrennung des stark elektrolythaltigen und wenig spermafreundlichen Bulbourethralsekretes (POLGE, 1959; PAREDIS, 1961).

Für niedrige Lagerungstemperaturen ist die Verwendung der spermareichen Ejakulatsfraktionen besser geeignet als die Gesamtejakulate. (ITO und Mitarb. 1948; BIALY und SELF, 1959; HOFFMANN, 1959; NIWA und Mitarb.,1959; POLGE,1959; HANSEN und Mitarb., 1960; MELROSE und O'HAGAN, 1959; BADER, 1964 u.a.)

MANN (1954) stellte folgende allgemeine Grundsätze für einen idealen Spermaverdünner auf: " Er sollte isotonisch sein, eine wirkungsvolle Abpufferung gewährleisten, in ausreichender Menge Nährstoff bieten, eine antibakterielle Wirkung haben, Schutzkolloide enthalten, antioxydierend wirken, gegen plötzliche Temperaturwechsel schützen, in gebrauchsfertiger Form haltbar sein und die volle Befruchtungsfähigkeit über eine längere Konservierungszeit bei niedrigen Temperaturen in vitro erhalten."
Daher wurden die Verdünner im Hinblick auf ihre Schutzkolloidwirkung und ihren Gehalt an Nährstoffen für die Samenkonservierung zusammengestellt.

LASLEY und BOGART (1944) stellten fest, daß ein Eidotterphosphatverdünner die Resistenz der Spermien gegenüber Temperaturveränderungen steigert.
NOLL (1949) konnte bei einer Lagerungstemperatur von + 5°C eine Verlängerung der Spermienbeweglichkeit auf 9 - 11 Tage erreichen, wenn er dem Verdünner reinen Eidotter im Verdünnungsverhältnis 1 : 2 zusetzte.
ROY (1955) erzielte mit einem Glycin-Eidotter-Verdünner bei + 4°C eine gute Beweglichkeit bis zu 30 Stunden.
POLGE (1956) beobachtete in einem Glukose- bzw. Glycin-Eidotterverdünner bei + 5°C eine Spermabewegung bis zu 6 Tagen. DZIUK (1958) verwendete für eine Lagerungstemperatur von + 7°C einen Glukose-Bikarbonat-Eidotter-Verdünner und erzielte nach 72-stündiger Konservierung bei Besamungen einen Befruchtungserfolg von 42%.
Über die Anwendung eines Glukose-Eidotter-Verdünners für tiefe Lagerungstemperaturen berichteten ferner HOFFMANN (1959), HESS und Mitarb. (1960), sowie FEREDAN und SLOVESCU (1961). Mit einem Natriumzitrat-Eidotter-Verdünner hatten SETTERGREN (1958) und BANE (1959) gute Konservierungserfolge von Ebersamen.
ROTHE (1962) konnte bei einer Konservierungstemperatur von + 4°C mit einem Natriumzitrat-Glycin-Sufanilamid-Verdünner bis zu 2 Tagen die Anfangsbeweglichkeit der Eberspermien erhalten.
Nachdem THACKER und ALMQUIST (1948) mit Milchverdünnern eine Verbesserung der Konservierungsergebnisse von Bullensamen erzielen konnten, gelang Milch in ihren verschiedenen Zubereitungsformen in der Folgezeit auch in der Eberspermakonservierung zur Anwendung.
Milch ist wegen ihrer Zusammensetzung, ihres Nährstoff-

gehaltes sowie ihrer guten puffernden Eigenschaften als Samenverdünner besonders gut geeignet. (ALMQUIST, 1954)
PRACHOFF (1958) berichtete von der guten Konservierungseigenschaft abgekochter Kuhmilch. Magermilchverdünner wurden von MELROSE und O'HAGAN (1959) und SPREMBERG (1964) beschrieben.

Auch Milchen mit einem Zusatz von Eidotter fanden für die Ebersamenkonservierung bei tiefen Temperaturen bei mehreren Autoren Erwähnung. BONADONNA (1940) hatte die gute kolloidale Schutzwirkung frischen Eidotters festgestellt, besonders soll ein in frischen Dottern enthaltener Lipoid-Protein-Komplex die Spermien resistenter gegen einen Kälteschock machen.
Eine Kombination von Milch und Eidotter erwies sich daher als Samenverdünner besonders geeignet.

Wegen der stets gleichbleibenden Qualität und der guten Lagerungseigenschaften haben sich Trockenmagermilchpulver als Ausgangsstoff für die Ebersamenverdünnung bewährt. So wurde von dem erfolgreichen Einsatz resuspendierter Trockenmagermilchpulver unter Zusatz von Eidotter berichtet (HOFFMANN, 1959; PAREDIS, 1959; POLGE, 1959; WILLEMS, 1959; WETTKE und HUHN, 1962; SPREMBERG, 1964; ROHLOFF und KOHRING, unveröffentlicht, u.a.).
THACKER und Mitarb. (1954) wiesen auf die Notwendigkeit hin, Milchen vor ihrer Vermischung mit dem Sperma mindestens 10 Minuten auf + 77° bis 97°C zu erhitzen, um den an das Milcheiweiß gebundenen, spermafeindlichen

Faktor Lactenin durch Abspalten von Sulfhydrilgruppen unschädlich zu machen.

## III. Abkühlmethoden und Kühlgeschwindigkeiten

Die Widerstandsfähigkeit des Ebersamens ist äußeren Einflüssen gegenüber nur sehr gering. Besonders empfindlich reagiert Ebersamen auf plötzliche Temperatursenkungen (LASLEY und BOGART, 1944; GÖTZE, 1949).

Schon SPALLANZANI (zit.bei MANN, 1954) stellte das völlige Erlöschen der Bewegung von Hengstspermien fest, wenn er das Spermagefäß in den Schnee stellte. Wurde das Samengefäß anschließend auf eine Temperatur von + 27°C erwärmt, fand die Spermabewegung zu ihrem alten Umfang zurück. Diese von späteren Untersuchern bestätigte Erscheinung hatte einen wesentlichen Einfluß auf die gesamte Spermakonservierung.

Die Kälte setzt die Spermien in einen Zustand der Anabiose, und WALTON (1933) hielt deshalb ein Absenken der Temperatur in der Samenverdünnung für eine sehr wichtige Voraussetzung zur Aufrechterhaltung der Befruchtungsfähigkeit des Samens außerhalb des tierischen Organismus. Der Spermastoffwechsel wird durch tiefere Temperaturen reversibel gehemmt, die Anreicherung der Samenverdünnung mit toxischen Stoffwechselprodukten vermindert sich, und die Nährstoffe stehen den Spermien nach der Erwärmung und Reaktivierung in fast ursprünglicher Höhe zur Verfügung.

Wegen der besonders großen Kälteempfindlichkeit des Ebersamens ist beim Abkühlprozeß die Einhaltung eines kontinuierlichen Temperaturabfalls dringend angeraten (HANSEN und JAKOBSEN, 1958; HOFFMANN, 1959; PAREDIS, 1959; WILLEMS, 1959; HESS und Mitarb., 1960; FEREDAN und SLOVESCU, 1961; ROTHE, 1962 u.a.).
MILOWANOW (1934) berichtete, daß die Spermien bei einer zu schnellen Abkühlung in einen Zustand der Abiose verfallen, den er als "Kälte- oder Temperaturschock" bezeichnete. Dieser trete sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen ein.
GÖTZE (1949) stellte fest, daß verdünntes Sperma gegen Temperaturen unter + 15°C nicht so empfindlich sei wie unverdünntes Sperma.
ITO und Mitarb.(1948) empfahlen als optimale Lagerungstemperatur für unverdünntes Ebersperma im Gesamtejakulat + 15° bis + 20°C, für die fraktioniert gewonnenen spermareichen Anteile der Ejakulate dagegen Temperaturen von + 3° bis + 10°C.
POLGE (1959) stellte fest, daß für die Überlebensfähigkeit der Spermien neben den Temperaturverhältnissen auch der Verdünnungsgrad der Spermien eine Rolle zu spielen scheine.

Über die Kühlgeschwindigkeiten bei der Konservierung von Ebersamen werden von einigen Autoren sehr unterschiedliche Angaben gemacht.
MILOWANOW und SOKOLOWSKAJA (1960) kühlten in 10 Stunden von Zimmertemperatur auf 0°C ab, FEREDAN und SLOVESCU (1961) benötigten für den gleichen Kühlprozeß 10 - 12 Stunden.

Eine Temperatursenkung von weniger als 5°C pro Stunde wurde von DZIUK (1958) eingehalten, als er Samenverdünnungen von + 24° auf + 7° C abkühlte.
MILOWANOW (1957) schlug als Temperatursenkungsgeschwindigkeit für Ebersamen folgenden Zeitplan vor:

| Zeit/Std. | Temperatur der Samenverdünnung (° C ) |
|---|---|
| 1 | 22 - 28 |
| 2 | 13 - 20 |
| 3 | 8 - 14 |
| 4 | 5 - 10 |
| 5 | 3,5 - 7 |
| 6 | 2,5 - 5 |
| 7 | 1,5 - 3 |
| 8 | 1,0 - 2,5 |
| 9 | 0,5 - 2,0 |
| 10 | 0,3 - 1,5 |

Die angeführte Abkühlgeschwindigkeit wurde von ihm erreicht, indem er die in Mull verpackten Samenportionen in ein Gefäß stellte, das von außen mit Kristalleis gekühlt wurde.
Andere Autoren erreichten eine langsame Temperatursenkung durch ein Wasserbad im Kühlschrank (PAREDIS, 1959; WILLEMS, 1959; WETTKE und HUHN, 1962).
HOFFMANN (1959) kühlte die Spermaproben von + 25° C um 1°C/2 Minuten auf + 5°C ab und lagerte sie bei dieser Temperatur.

Sehr eingehend befaßte sich ROTHE (1962) mit dem Problem der langsamen Abkühlung konservierten Ebersamens. Er untersuchte eine Reihe von Isoliermaterialien und prüfte ihre Eignung für den Abkühlprozeß der Samenportionen. Eine optimale Temperaturabsenkung wurde von + 23° C auf + 4° C in 16 Stunden erreicht, wobei er besonders ein sehr langsames Temperaturgefälle in den ersten 2 - 3 Stunden für notwendig erachtete.
SPREMBERG (1963 und 1964) setzte die Samenportionen bei Zimmertemperatur in ein Schwammgummikissen und erreichte im Kühlschrank nach 7 - 8 Stunden eine Endtemperatur von + 5° C.

## IV. Glycerin als Verdünnerzusatz

Nachdem gute Erfahrungen über den Zusatz von Glycerin in der Bullensamenkonservierung bei tiefen Temperaturen vorlagen (POLGE und Mitarb., 1949; ALMQUIST, 1957 und 1959; MÄCKLE und TILLACK, 1960; MÄCKLE, 1961;TILLACK, 1961, u.a.), fand das Glycerin als Verdünnungszusatz auch in der Eberspermakonservierung Eingang. Obwohl die Wirkung des Glycerins auf Eberspermien von einigen Autoren sehr unterschiedlich beurteilt wurde, wurden Glycerinkonzentrationen von 4 - 24% bei der Tiefgefrierkonservierung von Eberejakulaten verwendet. (SETTERGREN, 1958; BANE, 1959; HOFFMANN, 1959; POLGE, 1959; HESS und Mitarb., 1960; BAIER, 1962 und BADER 1964)

ROY (1955) erzielte bei Zusatz von 10% Glycerin etwa 50% überlebende Eberspermien und konnte diesen Prozentsatz der Spermabeweglichkeit bei Kühlschranktemperatur für 3 Tage aufrechterhalten.
POLGE (1956) verwendete Glycerinzusätze zwischen 8 und 10%, teilte jedoch 1959 mit, daß bereits ein Zusatz von 5% Glycerin die Befruchtungsfähigkeit des konservierten Samens herabmindere. Er meinte, daß ein Glycerinzusatz von 10%, der als Frostschutz notwendig sei, die Befruchtungsfähigkeit gänzlich aufheben würde.
HESS und Mitarbeiter (1960) fanden keine deutlichen Unterschiede in der Motilität der Spermien bei Glycerinzusätzen von 0 und 6%, wenn der verdünnte Samen bei + 5°C aufbewahrt wurde.
Bei Untersuchungen über die optimale Glycerinkonzentration auf die Beweglichkeit von Eberspermien in verschiedenen Verdünnern konnte HOFFMANN (1959) eine Konzentration von 8 - 10% ermitteln. Konzentrationen über 10% erwiesen sich als nachteilig.
SPREMBERG (1964) stellte fest, daß Glycerin als Zusatz zu einem Milch-Eidotter-Verdünner auch in niedrigen Konzentrationen die Beweglichkeit der Spermien schädige.
ROHLOFF und KOHRING (unveröffentlicht) konnten dagegen eine Anhebung der Beweglichkeitsprozentsätze mit einem 20% Eidotter enthaltenden Magermilchverdünner gegenüber einem 10% Eidotter enthaltenenden Verdünner erzielen. Auffällig war, daß das Sperma sogenannter schlechter Konservierer durch Glycerinzusatz in der Konservierung bessere Untersuchungsergebnisse zeigte.
Über die Notwendigkeit einer Glycerinanpassung liegen in der Literatur unterschiedliche Mitteilungen vor. (BANE, 1959; HOFFMANN, 1959 u.a.).

## V. Reaktivierung des konservierten Ebersamens

Vor der mikroskopischen Beurteilung von konserviertem Samen hat es sich als notwendig erwiesen, die Spermien aus ihrem Zustand der mehr oder weniger tiefen Anabiose zu erwecken und ihren Stoffwechsel anzuregen.
In der vorliegenden Literatur werden sehr unterschiedliche Angaben über die angewandten Reaktivierungsmethoden von Ebersamenkonserven gemacht.

ITO und Mitarbeiter (1958), NIWA und Mitarbeiter (1959) sowie POLGE (1959) erwärmten und schüttelten die Samenkonserven vor der Untersuchung.
Eine Erwärmung der Samenportionen im Wasserbad von + 38°C wurde von HOFFMANN (1959) und BADER (1964) beschrieben.
Um einen erneuten Temperaturschock der Spermien zu vermeiden und um optimale Untersuchungsergebnisse zu erzielen, wurden von allen Autoren auf Körpertemperatur beheizte Mikroskope für die Untersuchungen verwendet.

Bei Ebersamen, der mit $CO_2$-gesättigten Verdünnern konserviert wird, kann der Spermastoffwechsel nur dann zur Aktivität zurückkehren, wenn das Kohlendioxyd aus der Samenverdünnung ausgetrieben wird. (SALISBURY und VANDEMARK, 1957). Daher erfordert die Reaktivierung der Spermien im $CO_2$-Verdünner eine besondere Behandlung. HAHN (1963) beschrieb eine Schütteleinrichtung, in der die Samengläser im Wasserbad von + 37°C für 20 Minuten bewegt wurden, auch DU MESNIL DU BUISSON (1957) verwendete eine ähnliche Apparatur.

LIESS und GROVE (1963) füllten den $CO_2$-gesättigten Ebersamen in einen Erlenmeyerkolben und schwenkten diesen in einem Wasserbad von + 40°C bis eine maximale Reaktivierung der Spermien erfolgt war (etwa 20 Minuten). SMIDT (1964) konnte bei 1 - 2 stündigem Schütteln der Samenverdünnungen in einem Wasserbad von + 39°C gegenüber einer einfachen Erwärmung der Spermaportionen den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien deutlich steigern.
WETTKE und ROHLOFF (1964), ROHLOFF (1964) sowie v.PUSCH (1965) verdünnten die Samenportionen im Verhältnis von 1 : 4 mit einem IVT - Verdünner ohne Eidotterzusatz und bebrüteten nach kräftigem Durchschütteln die Samenverdünnung für 30 Minuten im Brutschrank bei + 39°C. ROHLOFF und KOHRING (unveröffentlicht) konnten eine Steigerung der Spermienreaktivierung erreichen, wenn zur Samenverdünnung eine 3,5%ige Glukoselösung verwendet wurde. Neben einer Bebrütung der Spermaportion bei + 39°C für 30 Minuten erfolgte ein Schütteln der Samenverdünnungen in einem Schüttelgerät.

## C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

### I. Material und Methode

Für die vorliegenden Untersuchungen standen 4 Eber im Alter von 1 1/2 - 2 Jahren als Samenspender zur Verfügung. Zwei Eber gehörten der deutschen veredelten Landschweinrasse an, die anderen beiden waren Pietraineber. Der Einfachheit halber werden die Eber in dieser Arbeit fortlaufend mit 1 - 4 numeriert. Die Eber wurden während der gesamten Versuchszeit zweimal wöchentlich jeweils morgens vor dem Füttern zur Samenentnahme herangezogen. Die Samenentnahme erfolgte an einem bei v.PUSCH (1965) beschriebenen Phantom mit der von WETTKE und HUHN (1962) entwickelten und bei ROHLOFF (1964) und v.PUSCH (1965) ebenfalls verwendeten Doppelmantelvagina für Schweine.

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit gelangten nur die spermareichen Hauptphasen der Eberejakulate zur Konservierung, deshalb wurde der Samen fraktioniert gewonnen. Das Restejakulat wurde getrennt von den spermareichen Anteilen zum Zwecke der Ermittlung der Gesamtspermamenge ebenfalls aufgefangen.
Das aus dem frei endenden Vagineninnenschlauch bei der Samenentnahme abtropfende Ejakulat wurde wie oben beschrieben in Fraktionen getrennt in mit Zellstoff von außen isolierten und vorgewärmten Erlenmeyerkolben aufgefangen und im Anschluß daran sofort spermatologisch ausgewertet und konserviert.

Bei der Samenuntersuchung wurden neben der Größe der spermareichen Ejakulatsphasen, die Gesamtmengen, die Dichten, die pH-Werte und die prozentuale Vorwärtsbewegung der Spermien in jedem Ejakulat ermittelt. Es wurden nur solche Ejakulate konserviert, deren geschätzter prozentualer Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien in den dichten Ejakulatsphasen mindestens 85% betrug.

Die Beweglichkeitsuntersuchungen am frisch gewonnenen Ejakulat sowie die täglichen Auswertungen der Konservierungsergebnisse erfolgten bei 400facher Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop der Firma ZEISS, das mit Hilfe eines Plexiglasumbaues isoliert und auf + 39°C beheizt worden war. Die pH-Wert-Ermittlung wurde mit einem elektrischen pH-Meter der Firma KNICK vorgenommen. Zur Dichtebestimmung fand das Spermiodensimeter nach KARRAS Verwendung, das nach Meinung von WETTKE und HUHN (1962) für Routineuntersuchungen von Ebersamendichten geeignet ist.
Die Mengenbestimmung der Ejakulationsfraktionen wurde nach Abfiltern der Bulbourethraldrüsensekrete in sterilen und vorgewärmten Glasmensuren vorgenommen.

In den Konservierungsversuchen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Samenverdünner verwendet:

Verdünner 1 : IVT - Verdünner nach VANDEMARK und SHARMA (1957) ohne Sulfanilamid jedoch mit einem Eidotterzusatz von 40% und unter Zufügung einer Antibiotikaschere von 1 Mill. I.E. Penicillin G und 1 g Dihydrostreptomycinsulfat pro Liter Aqua destillata.

Verdünner 2 : 10%iger Magermilchverdünner (re - suspendiert aus Trockenmagermilch-pulver "MOLICO" der Firma NESTLE AG) mit Zusatz von 40% Eidotter und der unter Verdünner 1 angeführten Anti-biotikaschere.

Verdünner 3 : Glukose-Eidotter-Verdünner nach HOFFMANN (1959) jedoch mit einem Eidotterzusatz von 40% und mit der bei Verdünner 1 angeführten Antibiotikaschere.

Verdünner 4 : 10%iger Magermilchverdünner ("MOLICO" - wie bei Verdünner 2) mit einem Zusatz von 10% doppelt destiliertem Glycerin der Firma RIEDEL DE HAEN und 20% Ei-dotter. Der Antibiotikazusatz erfolgte wie bei Verdünner 1.

Die Verdünnerzubereitung erfolgte jeweils am Abend vor den Konservierungstagen, wobei die Magermilchverdünner für 10 Minuten auf + 95°C erhitzt wurden.

Für die Gewinnung des reinen Eidotters wurden die Dotterkugeln auf Filtrierpapier vom Eiklar getrennt und nach Anstechen der Dotterhaut durch sterile Gaze dem Verdünner zugesetzt. Eine gleichmäßige Verteilung des Eidotters in den Verdünnern erfolgte anschließend.
Es wurden nur nestfrische Junghenneneier für die Verdünnerzubereitungen verwendet.
Der Glycerinzusatz zum Verdünner 4 erfolgte ebenfalls am Abend vor der Konservierung.

Vor den Samenentnahmen wurden die Verdünner nach dem Verfahren von EIBL (1959) bei konstanter Temperatur von + 30°C mit gereinigtem $CO_2$-Gas gesättigt, der Antibiotikazusatz erfolgte nach Abschluß der Durchgasung. Die ebenfalls auf + 30°C temperierten spermareichen Ejakulatsfraktionen wurden mit den $CO_2$-durchgasten Verdünnern im Verhältnis 1 : 1 in 10 ml fassenden Zuschmelzampullen konserviert. Der Zeitraum zwischen der Samengewinnung und dem Zuschmelzen der Ampullen war niemals größer als 10 Minuten. Nach dem Zuschmelzen wurden die Samenampullen in vorbereitete Isolierkissen gebracht.

Da bei einer Konservierungstemperatur von + 1°C die Ebersamenverdünnungen durch eine langsame und möglichst kontinuierliche Temperatursenkung auf die endgültige Lagerungstemperatur gebracht werden müssen, wurden in Vorversuchen für diesen Zweck folgende auf Kissenform hergerichtete Isoliermaterialien geprüft:

1. Schaumstoff

2. Schaumstoff zusätzlich von außen mit Holzfaserplatten verkleidet

3. Styropor

Die Isolierkissen hatten eine Größe von 20 x 30 cm, eine Höhe von 20 cm und konnten in angepaßten Löchern 24 Samenzuschmelzampullen aufnehmen. Die Kissen waren zweiteilig und die Mantelstärke der Isolierkissen betrug nach allen Richtungen mindestens 5 cm.
Zum Schutz gegen Kondensfeuchtigkeit im Kühlschrank waren die Isolierkissen allseitig mit Tesadur 651 beklebt und mit einer kunststoffhaltigen Farbe (CAPAROL) gestrichen worden.
Die in den Isolierkissen verpackten Samenampullen wurden nach Abkühlung auf Zimmertemperatur etwa 50 - 60 Minuten nach dem Zuschmelzen in den Kühlschrank mit einer Temperatur von + 1°C gebracht.
Das Absinken der Temperatur in der Samenverdünnung sowie die Temperatursenkungsgeschwindigkeiten wurden mittels eines Lichtmarkengalvanometers (MULTIFLEX, Dr. Lange, Berlin) mit einem Empfindlichkeitsbereich von $5.10^{-8}$A/mm und einem Eingangswiderstand von 15 Ω sowie mit einer Bimetallelektrode (Kupfer-Constantandraht) bis zum Erreichen der Lagerungstemperatur ( + 1°C ) bei allen 3 Isoliermaterialien gemessen. Für die Hauptversuche fanden nur Isolierkissen aus Styropor Verwendung.
Zur Konservierung gelangten in den Vor- und Haupt

versuchen die spermareichen Fraktionen von insgesamt 140 Eberejakulaten. Diese teilten sich auf die 4 Verdünner wie folgt auf:

28 Ejakulate in Verdünner 1
48 Ejakulate in Verdünner 2
32 Ejakulate in Verdünner 3
32 Ejakulate in Verdünner 4

140 Ejakulate insgesamt

In jeder Konservierungsreihe wurde über einen Zeitraum von 6 Tagen (144 Std.) täglich eine Ampulle geöffnet und nach Reaktivierung der Samenverdünnung der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien unter dem Mikroskop ermittelt. Je 1 ml des konservierten Samens wurde sowohl mit einem IVT - Verdünner (ohne Sulfanilamid und ohne Eidotterzusatz) als auch mit einer 3,5%igen Glukoselösung im Verhältnis 1 : 4 verdünnt. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte, nachdem die verdünnten Samenportionen für 30 Minuten in einem Brutschrank bei + 39°C bebrütet und anschließend 10 Minuten in einem IKA-Schüttler geschüttelt worden waren. Das Mikroskop wurde mit Kapillarpipetten beschickt.
In abgedeckten Tropfen der Samenverdünnung wurde der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien geschätzt.
Alle für die Spermauntersuchung und -konservierung verwendeten Glasgeräte waren gesäubert, fettfrei, sterilisiert und vorgewärmt.

## II. Versuchsergebnisse

### 1. Spermauntersuchungen

Bei den Untersuchungen der spermareichen Hauptphasen der in dieser Arbeit konservierten 140 Ejakulate wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Durchschnittswerte gefunden. (Extremwerte in Klammern)

| | | |
|---|---|---|
| Spermamenge 1 (ml) | 43,61 | ( 25 - 75 ) |
| Spermamenge 2 (ml) | 332,58 | ( 110 - 990 ) |
| Vorwärtsbewegungen (in %) | 91,50 | ( 85 - 95 ) |
| Dichten (Mill./$mm^3$) | 0,667 | (0,262 - 1,250) |
| pH-Werte | 7,33 | (7,09 - 7,56 ) |

Tabelle 1

In den Versuchsergebnissen der Tabelle 1 sowie in den weiteren Tabellen dieser Arbeit sind die Mengenangaben der Ejakulate folgendermaßen bezeichnet:

Spermamenge 1 = die für die Konservierungsversuche verwendeten spermareichen Hauptphasen der einzelnen Ejakulate.

Spermamenge 2 = Mengen der Gesamtejakulate.

Die spermatologischen Untersuchungsergebnisse sind in der Tabelle 2 nach Ebern getrennt dargestellt worden.

| Eber | Anzahl d. Ejakulate | Spermamengen (ml) 1 | 2 | V % | Dichten (Mill/mm$^3$) | pH-Werte |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 35 | 47,22 | 477,71 | 88,71 | 0,664 | 7,35 |
| 2 | 35 | 43,33 | 299,0 | 88,28 | 0,657 | 7,29 |
| 3 | 35 | 43,52 | 339,28 | 94,86 | 0,636 | 7,34 |
| 4 | 35 | 40,37 | 214,14 | 94,14 | 0,711 | 7,32 |

Tabelle 2

Die in dieser Tabelle aufgeführten Zahlen stellen Mittelwerte dar, die sich aus den Untersuchungsergebnissen sämtlicher Ejakulate der einzelnen Eber ( 1 - 4 ) ergaben.

Die Durchschnittswerte der Untersuchungsergebnisse der einzelnen Eber unterscheiden sich zum Teil recht deutlich, besonders im Hinblick auf die Gesamtmengen (Spermamengen 2) und auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien im frischen Ejakulat ( V % ), dagegen lagen die durchschnittlichen Spermamengen 1, sowie die Dichten und die pH-Werte aller Eber dicht beieinander.
Das größte Ejakulat wies Eber 1 auf, die kleinsten der Eber 4 sowohl in der spermareichen Hauptphase als auch im Gesamtejakulat. Entsprechend der kleinen Gesamtejakulate beim Eber 4 waren die Dichten größer als bei den Ebern 1 - 3.

## 2. Vorversuche

Die Vorversuche dienten dem Zweck, ein Isoliermaterial zu finden, das eine langsame und kontinuierliche Abkühlung der Samenampullen von Zimmertemperatur auf die Lagerungstemperatur von + 1°C im Kühlschrank möglich machte.

### a) Schaumstoffkissen (Kissen 1)

Je 12 spermareiche Hauptphasen gelangten mit den Verdünnern 1 (IVT - Verdünner) und Verdünner 2 (Magermilchverdünner mit 40% Eidotter) zur Konservierung. Die Abkühlgeschwindigkeiten der Samenkonserven betrug in diesem Isoliermaterial von Zimmertemperatur auf + 1°C = 3 Stunden.
In der Abbildung 1 ist in Kurvenform die Abkühlungsgeschwindigkeit graphisch dargestellt.

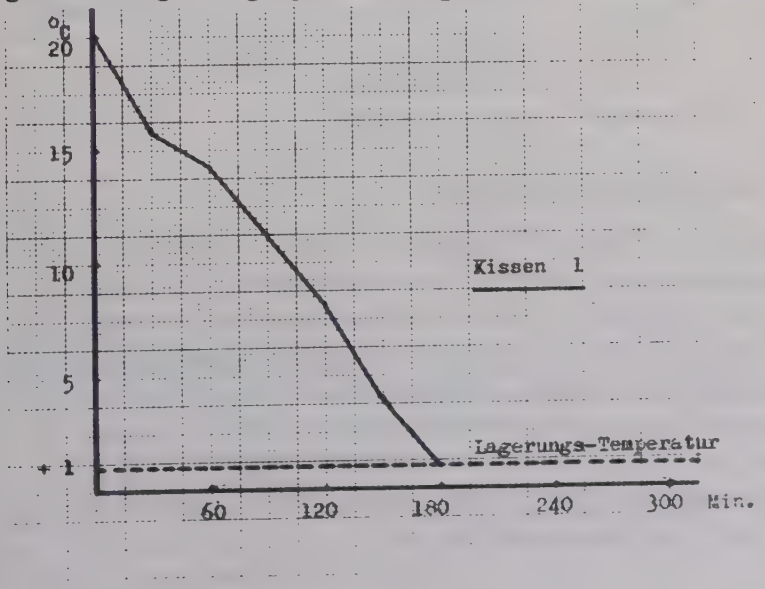


Abb. 1

In der Tabelle 3 sind die durchschnittlichen Beweglichkeitsprozentsätze der Spermien aus den 12 Ejakulaten in beiden Verdünnern aufgezeichnet. Die Zahlen in Klammern stellen Extremwerte dar.

| | Beweglichkeitsprozentsätze in Stunden | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Verdünner | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
| Verdünner 1 | 4 (5-10) | 0,6 (5- z) | z x) | - | - | - |
| Verdünner 2 | 33,7 (5-65) | 16,5 (5-50) | 10 (5-40) | 3,4 (0-30) | 1,5 (0-15) | 0,9 (0 - 5) |

x) z = Nur noch Zittern, keine Vorwärtsbewegung mehr.

Tabelle 3

## Besprechung der Ergebnisse

Obwohl im Verdünner 2 wesentlich bessere Ergebnisse in der Aufrechterhaltung der Spermienbewegung im Gegensatz zu Verdünner 1 erzielt werden konnten, bestand kein Zweifel darüber, daß die Abkühlungsgeschwindigkeit der Spermienverdünnung im Kissen 1 zu groß war. Trotz eines 40%igen Eidotterzusatzes in beiden Verdünnern schien durch die schnelle Temperatursenkung - in der 1. Stunde nahezu 6°C - eine irreversible Schädigung der Spermien eingetreten zu sein.

b) Schaumstoffkisen (Kissen 2)
zusätzlich mit Hartfaserplatten verkleidet

Um eine bessere Isolierung der Samenampullen zu erreichen, wurde das Schaumstoffkissen (Kissen 1) zusätzlich von allen Seiten mit Holzfaserplatten verkleidet. Die Abkühlungsdauer der Samenkonserven betrug in diesem Kissen von + 20°C Zimmertemperatur auf + 1°C Kühlschranktemperatur = 6 Stunden und 20 Minuten.

In der Abbildung 2 ist in Kurvenform die Abkühlungsgeschwindigkeit graphisch dargestellt.

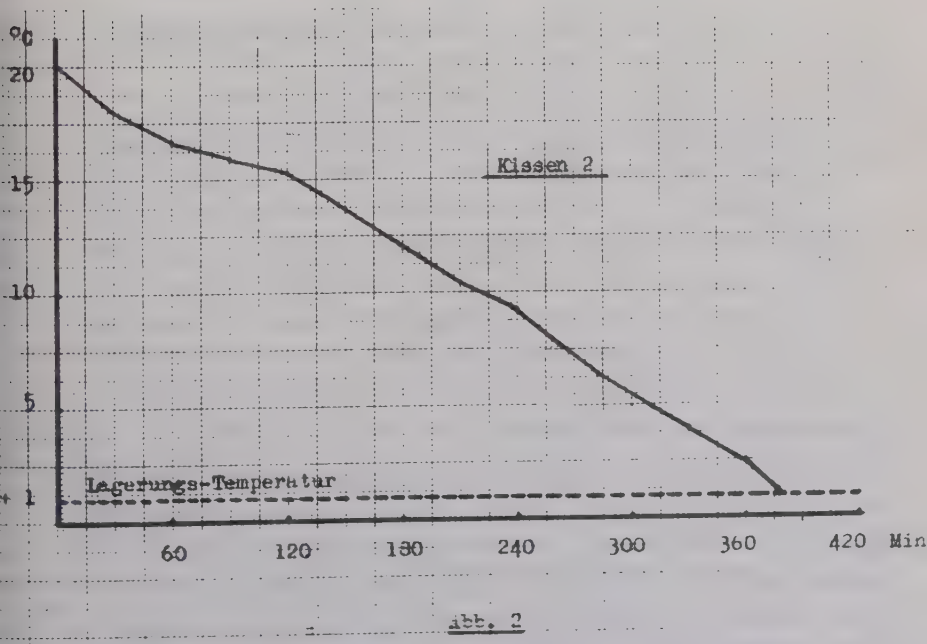


Abb. 2

In den Verdünnern 1 und 2 gelangten in den Kissen 2 je 8 spermareiche Hauptphasen zur Konservierung. In täglichen Untersuchungen wurden die in der Tabelle 4 aufgeführten prozentualen Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien in beiden Verdünnern ermittelt. Es handelt sich in dieser Tabelle, wie auch in Tabelle 3, um Durchschnittswerte, die aus den jeweils 8 Einzelmessungen ermittelt wurden. Die Zahlen in Klammern stellen Extremwerte dar.

| | Beweglichkeitsprozentsätze in Stunden | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Verdünner | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
| Verdünner 1 | 18 ( 5-40) | 8,7 (5-25) | 6,4 (z-15) | 3,2 (0-10) | z[x)] (0- z) | - |
| Verdünner 2 | 38,2 (10-50) | 21,6 (5-40) | 15,3 (5-25) | 7,5 (0-15) | 4,3 (0-10) | 1,7 (0 - 5) |

z = Nur noch Zittern, keine Vorwärtsbewegung mehr

Tabelle 4

Besprechung der Ergebnisse

Die im Kissen 2 ermittelten Untersuchungsergebnisse stellen eine deutliche Verbesserung gegenüber den Resultaten im Kissen 1 dar. Die Beweglichkeitsprozentzahlen im Magermilchverdünner (Verdünner 2) sind während der gesamten Versuchszeit nahezu doppelt so groß wie im IVT - Verdünner (Verdünner 1), dennoch

konnten diese Resultate keineswegs zufriedenstellen. Bemerkenswert ist, daß die Ejakulate von 2 der 4 Eber relativ gute Konservierungsergebnisse gegenüber ausgesprochen schlechten Beweglichkeitsraten der Spermien von den anderen beiden Ebern zeigten.

Die Abkühlungsgeschwindigkeit im Kissen 2 verlief wesentlich langsamer als im Kissen 1. Der Temperaturabfall in der 1. Stunde = 3,3°, in der 2. Stunde = 1,3°. Offensichtlich scheint die Temperatursenkung in der 1. Stunde jedoch noch zu schnell zu erfolgen.

c) Styroporkissen (Kissen 3)

Mit dem Kissen 3 wurde der Schaumstoff Styropor als Isoliermaterial geprüft. Die Temperaturabsenkungen wurden anhand einer Eichkurve gemessen, die wie bei den Kissen 1 und 2 durch mindestens 20 Einzelmessungen mittels des Lichtmarkengalvanometers und der Bimetallelektrode aufgestellt worden war. Die Isolierfähigkeit dieses Materials war erheblich besser als bei den ersten beiden Isolierkissen. Der Temperaturabfall von Zimmertemperatur ( + 20°C ) auf Kühlschranktemperatur (+ 1°C) erfolgte in genau 10 Stunden.

In der Abbildung 3 ist die Abkühlungsgeschwindigkeit der Samenkonserven in Kurvenform dargestellt.

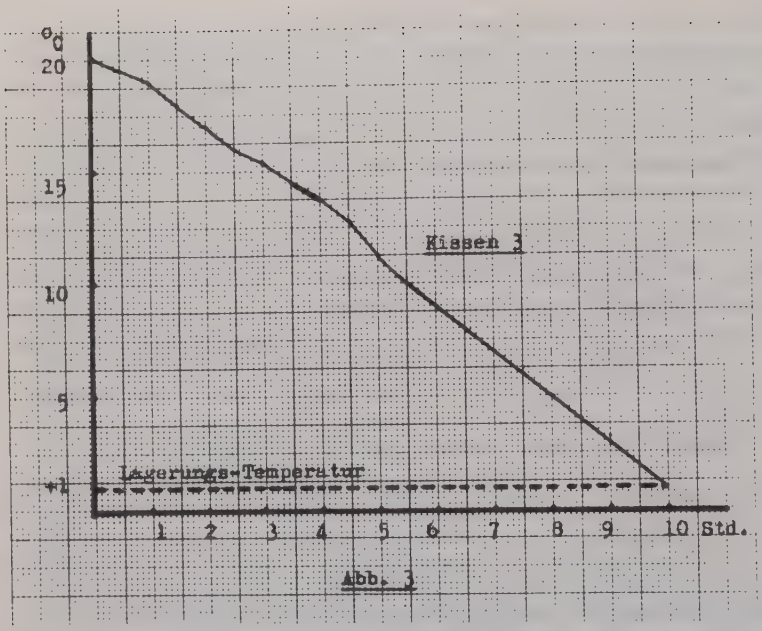


Abb. 3

Besprechung der Ergebnisse

Aus der Abbildung 3 ist zu ersehen, daß der Temperaturabfall im Kissen 3 sehr langsam und gleichmäßig verlief. In der 1. Stunde war eine Temperatursenkung von 1°C und in der 2. und 3. Stunde von maximal 2°C zu beobachten. Da der weitere Verlauf der Temperaturkurve sehr regelmäßig verlief, fanden Kissen aus dem Isoliermaterial Styropor mit der zusätzlichen Verkleidung gegen Kondensfeuchtigkeit im Kühlschrank in den Hauptversuchen dieser Arbeit Verwendung. Auf eine Darstellung der Konservierungsergebnisse mit diesem Kissen soll an dieser Stelle verzichtet werden. Die mit diesem Kissen durchgeführten Konservierungsversuche sind in die Ergebnisse der Hauptversuche eingegliedert worden.

3. Hauptversuche

a) Konservierungsergebnisse mit dem Verdünner 1
(modifizierter IVT - Verdünner)

Im Verdünner 1 gelangten 12 spermareiche Hauptphasen zur Konservierung (von 4 Ebern je 3 Ejakulate). Der modifizierte IVT - Verdünner hatte nach der $CO_2$-Absättigung einen pH-Wert von 6,47 (Extremwerte 6,39 und 6,58). Dieser änderte sich durch Hinzufügen der Antibiotikaschere nur unwesentlich. In vergleichenden Untersuchungen wurde beim Reaktivierungsprozeß neben dem eidotter- und sulfanilamidfreiem IVT - Verdünner eine 3,5%ige Glukoselösung geprüft. Die Ejakulate wurden für eine 6tägige Versuchszeit konserviert und es erfolgte die Beurteilung der Konservierungsfähigkeit des Verdünners nach einer Lagerungstemperatur von + 1°C durch tägliche Bestimmung der prozentualen Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien in den Samenverdünnungen.

Die Konservierungsergebnisse der 12 Ejakulate sind in der Tabelle 5 als Durchschnittswerte nach Reaktivierungsverfahren getrennt aufgeführt (in Klammern Extremwerte). Die Tabelle 6 gibt eine Darstellung der Konservierungsergebnisse sämtlicher in diesem Verdünner konservierten Ejakulate.

Verdünner 1 (Durchschnittswerte)

Beweglichkeitsprozentzahlen nach Stunden

| Reaktivierungs-verfahren | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| IVT (modifiziert) | 20,4 (5-50) | 5 (0-20) | - | - | - | - |
| 3,5% Glukoselösung | 32,1 (5-60) | 13,3 (5-40) | 2,5 (0-10) | 0,4 (0 - 5) | - | - |

Tabelle 5

Besprechung der Ergebnisse im Verdünner 1

Bei der Konservierung der 12 spermareichen Ejakulatsphasen im modifizierten IVT - Verdünner konnte festgestellt werden, daß die Aufrechterhaltung der Spermienbeweglichkeit nur sehr gering war. Beim Reaktivierungsprozeß mit einer 3,5%igen Glukoselösung konnten nach 24 Stunden 12% mehr Spermien in Vorwärtsbewegung beobachtet werden, als dies bei der Reaktivierung mit einem modifizierten IVT-Verdünner der Fall war. Die Überlegenheit der Glukoselösung war auch an den folgenden Tagen offensichtlich, obwohl auch diese Versuchsergebnisse keineswegs über den schlechten Konservierungseffekt dieses Verdünners hinwegtäuschen können.
Dieser Verdünner dürfte bei dieser niedrigen Lagerungstemperatur kaum Aussichten auf Erfolg haben.

Verdünner 1

| Lfd. Nr. | Eber Nr. | Spermamenge 1 | Spermamenge 2 | V % | pH-Wert | Dichte Spermamenge 1 | Beweglichkeitsprozente nach Stunden Reaktivierung mit 3,5% Glucoselösung 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 | IVT - Verdünner 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 85 | 990 | 90 | 7,26 | 1,250 | 20 | 5 | z | - | - | - | 5 | z | - | - | - | - |
| 2 | 2 | 85 | 485 | 85 | 7,28 | 1,116 | 5 | 5 | - | - | - | - | 5 | z | - | - | - | - |
| 3 | 3 | 105 | 480 | 95 | 7,31 | 0,816 | 45 | 20 | z | - | - | - | 30 | 10 | - | - | - | - |
| 4 | 4 | 80 | 255 | 95 | 7,32 | 1,116 | 30 | 30 | 10 | 5 | - | - | 50 | 20 | z | - | - | - |
| 5 | 1 | 70 | 740 | 85 | 7,27 | 0,983 | 50 | 10 | - | - | - | - | 40 | z | - | - | - | - |
| 6 | 2 | 60 | 130 | 90 | 7,31 | 0,816 | 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | 3 | 70 | 445 | 95 | 7,27 | 0,983 | 30 | 10 | 5 | z | - | - | 10 | 5 | - | - | - | - |
| 8 | 4 | 80 | 230 | 95 | 7,28 | 0,883 | 60 | 20 | 10 | z | - | - | 40 | 5 | - | - | - | - |
| 9 | 1 | 80 | 730 | 85 | 7,28 | 0,612 | 20 | z | - | - | - | - | z | - | - | - | - | - |
| 10 | 2 | 75 | 450 | 85 | 7,23 | 0,737 | 20 | 5 | - | - | - | - | 5 | - | - | - | - | - |
| 11 | 3 | 70 | 345 | 95 | 7,26 | 0,837 | 45 | 25 | 5 | - | - | - | 30 | 10 | - | - | - | - |
| 12 | 4 | 70 | 245 | 95 | 7,27 | 0,837 | 50 | 20 | z | - | - | - | 30 | 10 | - | - | - | - |

z = Zittern, keine Vorwärtsbewegung mehr

Tabelle 6

Die Streuung der Extremwerte war in beiden Reaktivierungsreihen deutlich. Die Konservierungsergebnisse waren mit den Ejakulaten der einzelnen Eber sehr unterschiedlich.

b) Konservierungsergebnisse mit dem Verdünner 2
(10%iger Lagermilchverdünner mit Zusatz von 40% Eidotter)

Mit dem Verdünner 2 wurden je 8 Ejakulate der 4 Versuchseber konserviert. Der Lagermilchverdünner hatte nach Durchgasung mit Kohlendioxyd einen pH-Wert von 5,86 (Extremwerte 5,79 und 5,94).
Wie beim Verdünner 1 wurden auch in dieser Versuchsreihe die Konservierungsergebnisse, die bei der Reaktivierung mit dme modifizierten IVT - Verdünner und der Glukoselösung erzielt werden konnten, einander gegenübergestellt.

Die Beweglichkeitsprozentzahlen der 32 Ejakulate sind als Durchschnittswerte, nach Reaktivierungsverfahren getrennt, in der Tabelle 7 aufgeführt, wobei die Extremwerte in Klammern gesetzt wurden.
Eine Aufstellung der einzelnen Konservierungsergebnisse sämtlicher 32 Ejakulate erfolgt in Tabelle 8 .

In der Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Tabelle 7 in Kurvenform dargestellt.

Verdünner 2

| Lfd. Nr. | Eber Nr. | Spermamenge 1 | Spermamenge 2 | V % | pH-Wert | Dichte Spermamenge 1 | Beweglichkeitsprozente nach Stunden Reaktivierung mit 3,5% Glucoselösung 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 | IVT - Verdünner 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 30 | 110 | 85 | 7,47 | 0,450 | 50 | 35 | 20 | 5 | z | - | 40 | 20 | 5 | - | - | - |
| 2 | 2 | 30 | 255 | 90 | 7,37 | 0,700 | 40 | 30 | 20 | 10 | - | - | 20 | 10 | 5 | 5 | - | - |
| 3 | 3 | 50 | 370 | 95 | 7,38 | 0,600 | 40 | 30 | 25 | 15 | 5 | 5 | 30 | 15 | 5 | 5 | z | - |
| 4 | 4 | 30 | 190 | 95 | 7,40 | 0,750 | 65 | 55 | 50 | 35 | 25 | 15 | 50 | 40 | 35 | 20 | 10 | 5 |
| 5 | 1 | 35 | 495 | 90 | 7,48 | 0,500 | 50 | 35 | 30 | 10 | 5 | - | 40 | 25 | 15 | 5 | 5 | - |
| 6 | 2 | 35 | 260 | 90 | 7,27 | 0,600 | 50 | 35 | 20 | 10 | 5 | - | 30 | 15 | 10 | 5 | - | - |
| 7 | 3 | 50 | 425 | 95 | 7,24 | 0,700 | 45 | 35 | 20 | 5 | 5 | - | 40 | 30 | 10 | z | - | - |
| 8 | 4 | 40 | 270 | 95 | 7,28 | 0,816 | 65 | 50 | 45 | 30 | 10 | 5 | 60 | 40 | 35 | 25 | 5 | z |
| 9 | 1 | 30 | 430 | 90 | 7,35 | 0,750 | 40 | 20 | 5 | z | - | - | 20 | 10 | z | - | - | - |
| 10 | 2 | 45 | 275 | 90 | 7,28 | 0,700 | 30 | 20 | z | - | - | - | 25 | z | - | - | - | - |
| 11 | 3 | 25 | 310 | 95 | 7,34 | 0,500 | 60 | 40 | 15 | 5 | - | - | 50 | 20 | 10 | z | - | - |
| 12 | 4 | 25 | 150 | 95 | 7,34 | 0,900 | 70 | 50 | 30 | 30 | 10 | 5 | 60 | 40 | 20 | 20 | 5 | - |
| 13 | 1 | 55 | 445 | 90 | 7,48 | 0,600 | 45 | 35 | 20 | 5 | - | - | 40 | 30 | 15 | 5 | - | - |
| 14 | 2 | 30 | 250 | 90 | 7,32 | 0,600 | 40 | 25 | 15 | z | - | - | 25 | 15 | 10 | z | - | - |
| 15 | 3 | 25 | 300 | 95 | 7,25 | 0,550 | 60 | 45 | 25 | z | - | - | 50 | 30 | 10 | z | - | - |
| 16 | 4 | 25 | 250 | 95 | 7,33 | 0,550 | 55 | 50 | 40 | 10 | - | - | 40 | 40 | 30 | 5 | - | - |
| 17 | 1 | 25 | 765 | 90 | 7,42 | 0,700 | 45 | 30 | 15 | 5 | 5 | - | 40 | 25 | 5 | 5 | - | - |
| 18 | 2 | 50 | 320 | 95 | 7,29 | 0,700 | 40 | 35 | 20 | 5 | 5 | - | 25 | 20 | 10 | z | - | - |
| 19 | 3 | 35 | 385 | 95 | 7,31 | 0,600 | 70 | 55 | 30 | 10 | 5 | z | 60 | 45 | 20 | 5 | - | - |
| 20 | 4 | 45 | 205 | 95 | 7,34 | 0,600 | 75 | 60 | 55 | 45 | 25 | 10 | 65 | 50 | 35 | 25 | 10 | 5 |
| 21 | 1 | 60 | 580 | 90 | 7,34 | 0,750 | 60 | 35 | 20 | 10 | 5 | z | 50 | 30 | 15 | 5 | z | - |
| 22 | 2 | 55 | 410 | 90 | 7,21 | 0,750 | 45 | 30 | 15 | 5 | 5 | - | 40 | 25 | 10 | 5 | 5 | - |
| 23 | 3 | 40 | 355 | 95 | 7,38 | 0,650 | 60 | 45 | 40 | 25 | 15 | 5 | 50 | 40 | 30 | 15 | 10 | z |
| 24 | 4 | 35 | 205 | 95 | 7,32 | 0,700 | 70 | 60 | 50 | 40 | 30 | 10 | 60 | 50 | 40 | 30 | 20 | 5 |
| 25 | 1 | 35 | 285 | 90 | 7,35 | 0,737 | 65 | 45 | 30 | 15 | 5 | z | 60 | 40 | 25 | 10 | z | - |
| 26 | 2 | 40 | 315 | 90 | 7,17 | 0,816 | 45 | 30 | 25 | 10 | - | - | 20 | 10 | 5 | - | - | - |
| 27 | 3 | 35 | 385 | 95 | 7,26 | 0,883 | 70 | 60 | 50 | 35 | 15 | 10 | 60 | 50 | 40 | 30 | 10 | 5 |
| 28 | 4 | 35 | 185 | 95 | 7,35 | 0,700 | 75 | 70 | 55 | 40 | 25 | 10 | 70 | 60 | 50 | 35 | 20 | 5 |
| 29 | 1 | 55 | 425 | 90 | 7,33 | 0,737 | 50 | 35 | 25 | 10 | z | - | 45 | 30 | 15 | 5 | - | - |
| 30 | 2 | 45 | 345 | 90 | 7,15 | 0,612 | 30 | 20 | 10 | 5 | - | - | 30 | 15 | 5 | z | - | - |
| 31 | 3 | 25 | 270 | 95 | 7,31 | 0,737 | 50 | 30 | 10 | 5 | 5 | - | 40 | 10 | 5 | 5 | - | - |
| 32 | 4 | 40 | 220 | 95 | 7,36 | 0,737 | 70 | 50 | 40 | 20 | 10 | z | 60 | 45 | 30 | 10 | 5 | - |

z = Zittern, keine Vorwärtsbewegung mehr

Tabelle 8

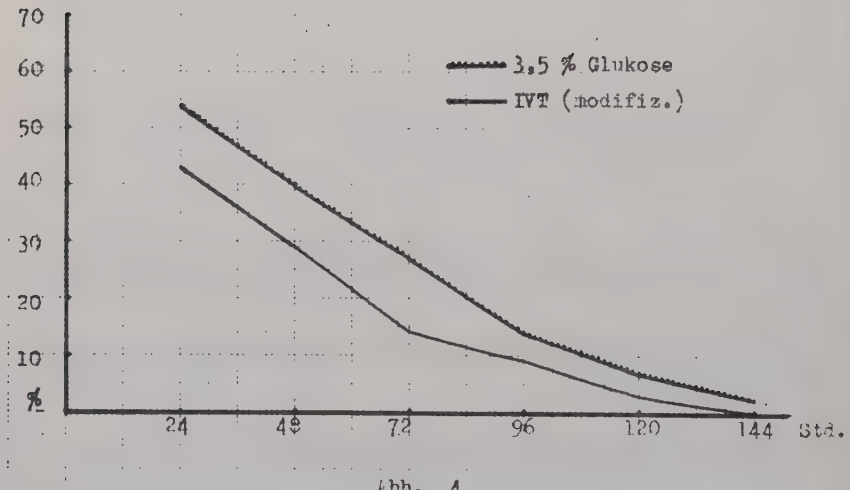
70
60
50
40
30
20
10
%
3,5 % Glukose
IVT (modifiz.)
24
48
72
96
120
144
Std.

Abb. 4

Verdünner 2 (Durchschnittswerte)

Beweglichkeitsprozentzahlen nach Stunden

| Reaktivierungsverfahren | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| IVT (modifiziert) | 43,2 (20-70) | 28,7 (10-60) | 14,2 (5-50) | 9,3 (2-35) | 3,2 (0-20) | 0,7 (0- 5) |
| 3,5% Glukose-lösung | 53,9 (30-75) | 40 (20-70) | 27,1 (z-55) | 14,2 (z-45) | 6,8 (0-30) | 2,3 (0-15) |

z = Nur noch Zittern, keine Vorwärtsbewegung mehr

Tabelle 7

In der Tabelle 9 sind die durchschnittlichen Beweglichkeitsprozentzahlen nach Ebern 1 - 4 getrennt aufgeführt worden, die Abbildungen 5 und 6 stellen diese Werte in Kurvenform nach Reaktivierungsverfahren dar.

Verdünner 2 Beweglichkeitsprozentzahlen in Stunden nach Ebern

| Eber | Reaktivierungsverfahren | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | IVT | 41,8 | 26,2 | 11,8 | 4,3 | 0,6 | - |
| | 3,5% Glukose | 50,6 | 33,7 | 20,6 | 7,5 | 2,5 | - |
| 2 | IVT | 26,8 | 13,1 | 6,8 | 0,6 | 0,6 | - |
| | 3,5% Glukose | 40 | 28,1 | 15,6 | 5,6 | 1,8 | - |
| 3 | IVT | 47,5 | 40 | 16,1 | 7,5 | 2,5 | 0,6 |
| | 3,5% Glukose | 56,8 | 42,5 | 26,8 | 12,5 | 6,2 | 2,5 |
| 4 | IVT | 58,1 | 45,6 | 34,3 | 21,2 | 9,2 | 2,5 |
| | 3,5% Glukose | 68,1 | 55,6 | 45,6 | 31,2 | 16,8 | 6,8 |

Tabelle 9

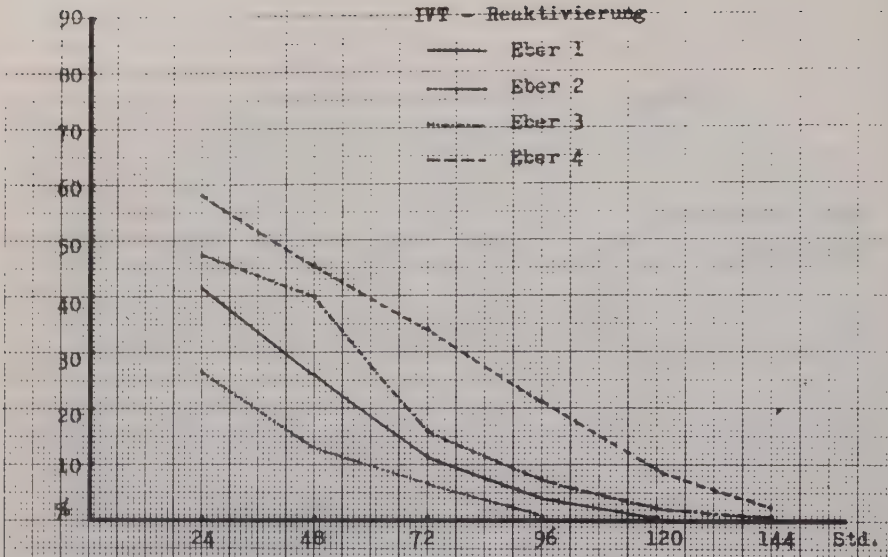
IVT - Reaktivierung
Eber 1
Eber 2
Eber 3
Eber 4
90
80
70
60
50
40
30
20
10
%
24
48
72
96
120
144
Std.

Abb. 5

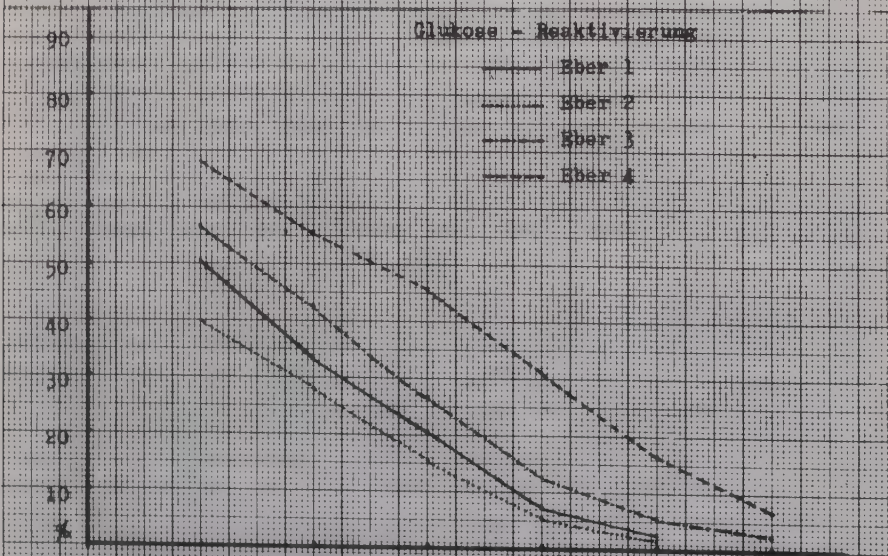
Glukose - Reaktivierung
Eber 1
Eber 2
Eber 3
Eber 4
90
80
70
60
50
40
30
20
10
%
24
48
72
96
120
144
Std.

Abb. 6

Besprechung der Ergebnisse im Verdünner 2

Die Prozentzahlen vorwärtsbeweglicher Spermien zeigten bei den konservierten Ejakulaten der einzelnen Eber im eidotterhaltigen Magermilchverdünner auffällige Unterschiede. Der Eber 4 wies sowohl nach 24 Stunden als auch während des gesamten Untersuchungsverlaufs bessere Konservierungsresultate auf als die übrigen 3 Eber. Sehr schlecht waren die Spermienbeweglichkeiten bei den Ejakulaten der Eber 1 und 2, die beide am 6. Untersuchungstag keinen Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien mehr zeigten.
Die Reaktivierung der Samenzellen mit der 3,5%igen Glukoselösung war bei allen 4 Ebern dem IVT - Reaktivierungsverfahren überlegen.
Bereits 24 Stunden nach der Konservierung lag der Spermienanteil mit Vorwärtsbewegung in der glukosereaktivierten Versuchsreihe um 10% über den IVT - reaktivierten Samenzellen.
Der beste Beweglichkeitswert mit 68,1% konnte beim Eber 4 am 1. Auswertungstag mit dem Glukoseverfahren erzielt werden. Diese Überlegenheit hielt über die gesamte Untersuchungszeit an.

C) Konservierungsergebnisse mit dem Verdünner 3
(Glukose-Eidotter-Verdünner)

Im Verdünner 3 wurden 32 spermareiche Hauptphasen (von 4 Ebern je 8 Ejakulate) konserviert.
Der Glukose-Eidotter-Verdünner hatte nach der $CO_2$-Sättigung einen pH-Wert von 5,62 (Extremwerte 5,54 und 5,68).
Entsprechend den Versuchsanordnungen bei den Verdünnern 1 und 2 wurden auch bei diesen Konservierungsversuchen durch Ermittlung der Beweglichkeitsprozentzahlen der Spermien die Glukosereaktivierung den Reaktivierungsverfahren mit dem IVT - Verdünner gegenübergestellt.

Die Prozentzahlen der vorwärtsbeweglichen Spermien aus 32 konservierten Ejakulaten sind in ihren Durchschnittswerten, nach Reaktivierungsverfahren getrennt, in der Tabelle 10 zusammengestellt. (Extremwerte in Klammern)

In der Tabelle 11 erfolgt eine Aufstellung der Beweglichkeitsprozentzahlen sämtlicher in diesem Verdünner konservierten Ejakulate.
Die Konservierungsresultate der Tabelle 10 sind in der Abbildung 7 graphisch dargestellt.

Verdünner 1

| Lfd. Nr. | Eber Nr. | Spermamenge 1 | Spermamenge 2 | V % | pH-Wert Spermamenge 1 | Dichte Spermamenge 1 | Beweglichkeitsprozente nach Stunden Reaktivierung mit 3,5% Glucoselösung 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 | IVT - Verdünner 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 30 | 110 | 85 | 7,47 | 0,450 | 35 | 20 | 10 | 5 | z | - | 20 | 10 | z | - | - | - |
| 2 | 2 | 30 | 255 | 90 | 7,37 | 0,700 | 30 | 25 | 20 | 5 | 5 | - | 10 | z | z | - | - | - |
| 3 | 3 | 50 | 370 | 95 | 7,38 | 0,600 | 35 | 30 | 20 | 10 | 5 | z | 25 | 10 | - | - | - | - |
| 4 | 4 | 30 | 190 | 95 | 7,40 | 0,750 | 50 | 45 | 40 | 30 | 20 | 10 | 40 | 10 | 10 | 5 | z | - |
| 5 | 1 | 35 | 495 | 90 | 7,48 | 0,500 | 20 | 20 | 15 | 5 | z | - | 25 | 15 | 10 | z | - | - |
| 6 | 2 | 35 | 260 | 90 | 7,27 | 0,600 | 20 | 10 | 5 | - | - | - | 20 | 10 | z | - | - | - |
| 7 | 3 | 50 | 425 | 95 | 7,24 | 0,700 | 30 | 25 | 15 | 5 | - | - | 30 | 20 | z | - | - | - |
| 8 | 4 | 40 | 270 | 95 | 7,28 | 0,816 | 60 | 40 | 30 | 20 | 5 | z | 50 | 35 | 15 | 5 | 5 | - |
| 9 | 1 | 30 | 430 | 90 | 7,35 | 0,750 | 20 | 10 | 5 | z | - | - | 10 | z | z | - | - | - |
| 10 | 2 | 45 | 275 | 90 | 7,28 | 0,700 | 15 | 10 | 5 | - | - | - | 5 | z | - | - | - | - |
| 11 | 3 | 25 | 310 | 95 | 7,34 | 0,500 | 50 | 30 | 25 | 5 | - | - | 40 | 10 | z | - | - | - |
| 12 | 4 | 25 | 150 | 95 | 7,34 | 0,900 | 60 | 50 | 25 | 10 | 5 | - | 50 | 30 | z | - | - | - |
| 13 | 1 | 55 | 445 | 90 | 7,48 | 0,600 | 30 | 20 | 5 | - | - | - | 25 | 5 | z | - | - | - |
| 14 | 2 | 30 | 250 | 90 | 7,32 | 0,600 | 35 | 20 | 5 | - | - | - | 15 | 5 | - | - | - | - |
| 15 | 3 | 25 | 300 | 95 | 7,25 | 0,550 | 60 | 40 | 20 | z | - | - | 40 | 10 | z | - | - | - |
| 16 | 4 | 25 | 250 | 95 | 7,33 | 0,550 | 60 | 50 | 40 | 5 | - | - | 50 | 40 | 20 | z | - | - |
| 17 | 1 | 25 | 765 | 90 | 7,42 | 0,700 | 40 | 25 | 10 | 5 | - | - | 25 | 5 | 5 | 5 | - | - |
| 18 | 2 | 50 | 320 | 95 | 7,29 | 0,700 | 40 | 25 | 20 | 10 | 5 | - | 30 | 10 | 5 | 5 | - | - |
| 19 | 3 | 35 | 385 | 95 | 7,31 | 0,600 | 60 | 45 | 30 | 15 | 5 | z | 50 | 35 | 25 | 10 | 5 | - |
| 20 | 4 | 45 | 205 | 95 | 7,34 | 0,600 | 65 | 55 | 50 | 35 | 15 | 5 | 60 | 50 | 45 | 30 | 10 | 5 |
| 21 | 1 | 60 | 580 | 90 | 7,34 | 0,750 | 40 | 20 | 10 | 5 | - | - | 25 | 10 | 5 | z | - | - |
| 22 | 2 | 55 | 410 | 90 | 7,21 | 0,750 | 45 | 25 | 10 | 5 | - | - | 30 | 10 | z | - | - | - |
| 23 | 3 | 40 | 355 | 95 | 7,38 | 0,650 | 45 | 35 | 30 | 15 | 10 | 5 | 40 | 30 | 20 | 5 | 5 | z |
| 24 | 4 | 35 | 205 | 95 | 7,32 | 0,700 | 50 | 45 | 30 | 15 | 10 | 5 | 40 | 30 | 20 | 5 | 5 | - |
| 25 | 1 | 35 | 285 | 90 | 7,35 | 0,737 | 50 | 35 | 20 | 5 | - | - | 40 | 20 | 5 | - | - | - |
| 26 | 2 | 40 | 315 | 90 | 7,17 | 0,816 | 40 | 20 | 10 | 5 | - | - | 30 | 10 | 5 | - | - | - |
| 27 | 3 | 35 | 385 | 95 | 7,26 | 0,883 | 50 | 45 | 30 | 15 | 5 | z | 40 | 40 | 25 | 10 | z | - |
| 28 | 4 | 35 | 185 | 95 | 7,35 | 0,700 | 60 | 50 | 40 | 25 | 5 | 5 | 50 | 40 | 30 | 10 | z | - |
| 29 | 1 | 55 | 425 | 90 | 7,33 | 0,737 | 40 | 30 | 10 | 5 | z | - | 40 | 25 | 5 | 5 | z | - |
| 30 | 2 | 45 | 345 | 90 | 7,15 | 0,612 | 30 | 10 | z | - | - | - | 20 | 5 | - | - | - | - |
| 31 | 3 | 25 | 270 | 95 | 7,31 | 0,737 | 30 | 10 | z | - | - | - | 20 | 5 | - | - | - | - |
| 32 | 4 | 40 | 220 | 95 | 7,36 | 0,737 | 50 | 30 | 25 | 5 | z | - | 45 | 20 | 15 | 5 | - | - |

z = Zittern, keine Vorwärtsbewegung mehr

Tabelle 11

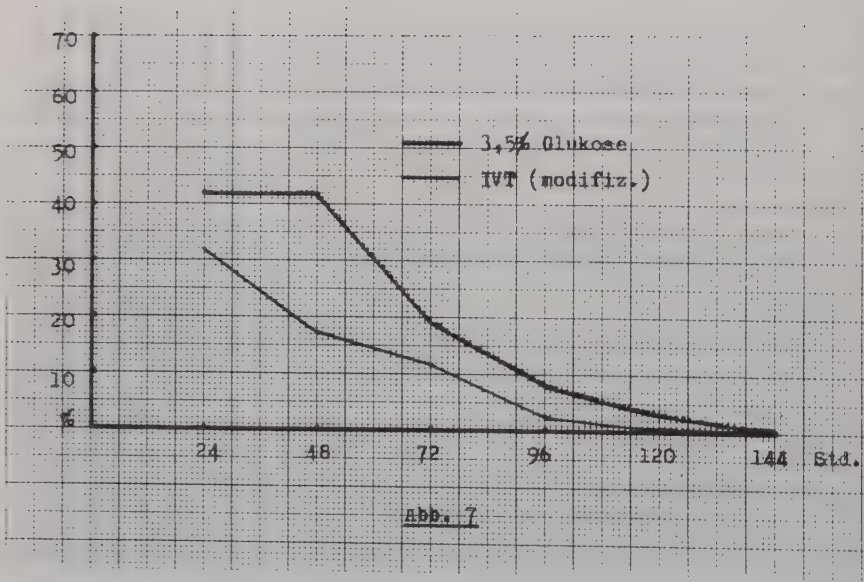
70
60
50
40
30
20
10
%
3,5% Glukose
IVT (modifiz.)
24
48
72
96
120
144
Std.

Abb. 7

Verdünner 3 (Durchschnittswerte)
Beweglichkeitsprozentzahlen nach Stunden

| Reaktivierungs-verfahren | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| IVT (modifiziert) | 32,1 ( 5-60) | 17,3 ( 5-50) | 11,9 (0-30) | 2,9 (5-30) | 0,9 (0-10) | 0,1 (0- 5) |
| 3,5% Glukose-lösung | 42,0 (15-65) | 41,8 (10-50) | 19,1 (5-50) | 8,1 (5-35) | 2,9 (5-20) | 0,9 (0-10) |

Tabelle 10

In der Tabelle 12 sind die durchschnittlichen Beweglichkeitsprozentzahlen nach Ebern getrennt aufgeführt worden, die Abbildungen 8 und 9 stellen diese Werte in Kurvenform dar.

Verdünner 3 Beweglichkeitsprozentzahlen in Stunden nach Ebern

| Eber | Reaktivierungs-verfahren | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | IVT | 26,2 | 11,2 | 3,7 | 1,2 | z[x)] | - |
| | 3,5% Glukose | 34,3 | 22,5 | 10,6 | 3,1 | z | z |
| 2 | IVT | 20 | 6,2 | 1,2 | 0,6 | - | - |
| | 3,5% Glukose | 31,8 | 18,1 | 9,3 | 3,1 | 1,2 | - |
| 3 | IVT | 34,3 | 20 | 8,7 | 3,1 | 1,2 | - |
| | 3,5% Glukose | 45 | 32,5 | 21,2 | 8,1 | 3,1 | 0,6 |
| 4 | IVT | 48,1 | 31,8 | 11,9 | 2,9 | 0,9 | 0,1 |
| | 3,5% Glukose | 56,8 | 45,6 | 19,1 | 8,1 | 2,9 | 0,9 |

x) z = Nur noch Zittern, keine Vorwärtsbewegung mehr

Tabelle 12

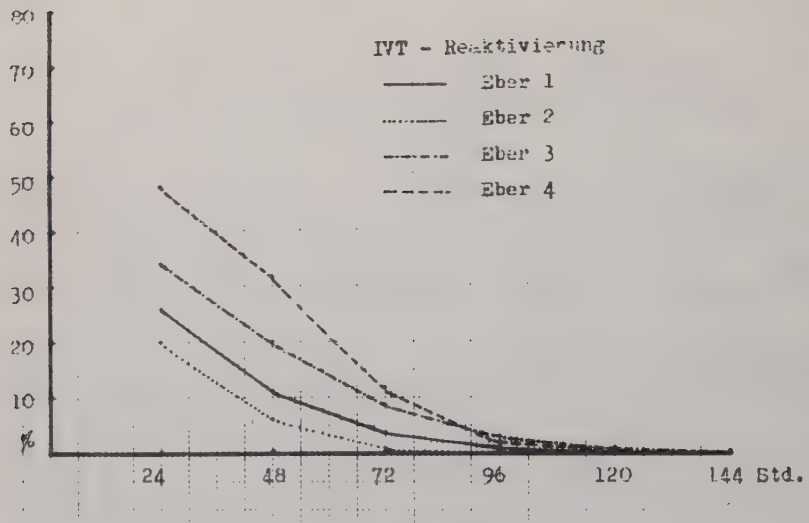
IVT - Reaktivierung
Eber 1
Eber 2
Eber 3
Eber 4
80
70
60
50
40
30
20
10
%
24
48
72
96
120
144 Std.

Abb. 8

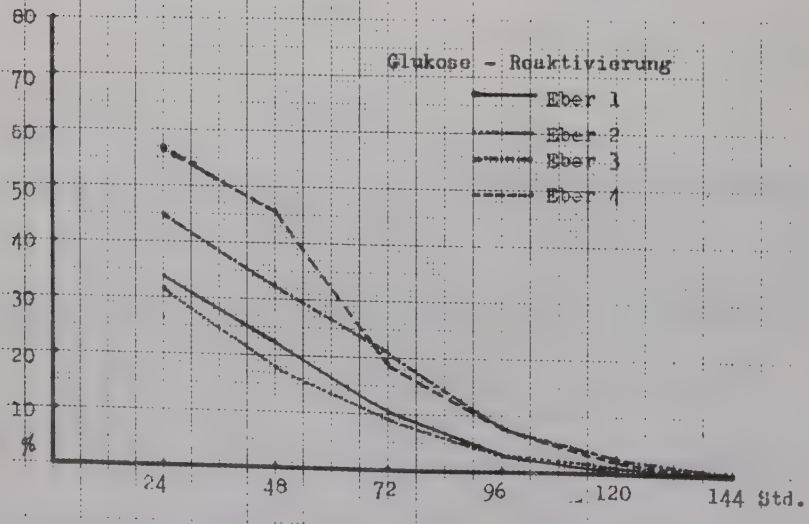
Glukose - Reaktivierung
Eber 1
Eber 2
Eber 3
Eber 4
80
70
60
50
40
30
20
10
%
24
48
72
96
120
144 Std.

Abb. 9

Besprechung der Ergebnisse im Verdünner 3

Bei den mit dem Verdünner 3 durchgeführten Konservierungsversuchen ergab sich bei einem Vergleich der Beweglichkeitsprozentzahlen von Eber 1 - 4, daß der Eber 2 am ersten Auswertungstag mit einem Prozentsatz von 20% vorwärtsbeweglicher Spermien (IVT - Re - aktivierung) bzw. 31,8% (Glukose-Reaktivierung) das schlechteste Konservierungsresultat aller Eber aufwies. Die Überlebensraten der Spermien nach 5-tägiger Lagerung waren beim Eber 1 ähnlich schlecht wie bei Eber 2. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Eber 1 und 2, zeigten die Ejakulate der Eber 3 und 4 weitaus bessere Spermabeweglichkeiten. Der Eber 4 erwies sich auch im Verdünner 3 mit seinen Konservierungs - ergebnissen den Ebern 1 - 3 überlegen. Sein Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien war nach der Glukose-reaktivierung am 1. Auswertungstag mit 56,8% nahezu 13% besser als Eber 3, und 22 bzw. 25% besser als die Beweglichkeitsprozentzahlen der Eber 1 und 2.

Trotz der relativ guten Anfangsbeweglichkeit der Spermien des Ebers 4 in diesem Verdünner können die Konservierungsergebnisse aller Eber insgesamt betrachtet in diesem Verdünner keinesweg zufriedenstellen.

d) Konservierungsergebnisse mit dem Verdünner 4
(10%iger Magermilchverdünner mit Zusatz von 20% Eidotter und 10% Glycerin)

Mit dem Verdünner 4 gelangten die spermareichen Phasen von jeweils 8 Ejakulaten der Eber 1 - 4 zur Konservierung. Der vorliegende Magermilchverdünner hatte bei Zusatz von 20% Eidotter und 10% Glycerin nach dem Durchgasen mit Kohlendioxyd einen pH-Wert von 5,86 (Extremwerte 5,82 - 5,91)
Wie auch bei den Verdünnern 1 - 3 wurden die Beweglichkeitsprozentzahlen nach 2 Reaktivierungsverfahren ermittelt.
Die Tabelle 13 zeigt die Mittelwerte der Beweglichkeitsprozentzahlen der 32 Ejakulate in beiden Reaktivierungsverfahren, wobei Extremwerte in Klammern darunter gesetzt wurden. Die Aufstellung der einzelnen Konser - vierungsergebnisse sämtlicher 32 Ejakulate erfolgt in Tabelle 14.
In der Abbildung 10 sind die Ergebnisse der Tabelle 13 in Kurvenform dargestellt.

Verdünner 4 (Durchschnittswerte)
Beweglichkeitsprozentzahlen nach Stunden

| Reaktivierungs-verfahren | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| IVT (Modifiziert) | 55 (25-80) | 38,6 (15-70) | 19,7 (10-50) | 10,6 ( 5-35) | 4,4 (5-25) | 0,6 (0-10) |
| 3,5% Glukose-lösung | 71,9 (60-85) | 60,7 (40-80) | 40,5 (20-70) | 33,6 (10-65) | 19,7 (5-40) | 6,6 (5-20) |

Tabelle 13

Verdünner 4

| Lfd. Nr. | Eber Nr. | Spermamenge 1 | Spermamenge 2 | V % | pH-Wert | Dichte | Beweglichkeitsprozente nach Stunden Reaktivierung mit 3,5% Glucoselösung | | | | | | IVT - Verdünner | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Spermamenge 1 | | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
| 1 | 1 | 50 | 940 | 85 | 7,33 | 0,675 | 70 | 60 | 35 | 30 | 25 | 10 | 50 | 25 | 15 | 10 | 5 | - |
| 2 | 2 | 40 | 240 | 90 | 7,28 | 0,975 | 70 | 60 | 55 | 45 | 35 | 15 | 60 | 30 | 15 | 10 | z | - |
| 3 | 3 | 60 | 410 | 95 | 7,22 | 0,675 | 80 | 50 | 50 | 50 | 30 | 20 | 60 | 30 | 20 | 20 | 10 | 5 |
| 4 | 4 | 55 | 275 | 95 | 7,27 | 0,825 | 80 | 60 | 50 | 50 | 30 | 20 | 75 | 50 | 25 | 25 | z | - |
| 5 | 1 | 50 | 660 | 85 | 7,38 | 0,450 | 70 | 60 | 40 | 30 | 10 | z | 50 | 40 | 10 | 5 | z | - |
| 6 | 2 | 30 | 220 | 90 | 7,36 | 0,825 | 80 | 60 | 45 | 35 | 5 | - | 65 | 30 | 10 | 5 | - | - |
| 7 | 3 | 35 | 335 | 95 | 7,32 | 0,550 | 80 | 75 | 60 | 50 | 15 | 5 | 55 | 40 | 10 | 5 | - | - |
| 8 | 4 | 45 | 155 | 95 | 7,28 | 0,675 | 85 | 70 | 65 | 65 | 20 | z | 70 | 60 | 10 | 10 | 5 | - |
| 9 | 1 | 70 | 395 | 85 | 7,45 | 0,500 | 70 | 60 | 50 | 40 | 15 | 5 | 45 | 15 | z | z | - | - |
| 10 | 2 | 45 | 265 | 90 | 7,40 | 0,500 | 70 | 55 | 45 | 35 | 10 | 5 | 50 | 20 | 10 | 5 | 5 | - |
| 11 | 3 | 25 | 345 | 95 | 7,34 | 0,450 | 70 | 50 | 30 | 20 | 5 | z | 60 | 30 | 10 | 5 | - | - |
| 12 | 4 | 25 | 165 | 95 | 7,32 | 0,525 | 70 | 60 | 55 | 40 | 30 | 15 | 50 | 30 | 10 | 5 | 5 | z |
| 13 | 1 | 25 | 435 | 85 | 7,56 | 0,450 | 70 | 60 | 40 | 25 | 5 | 5 | 50 | 35 | 10 | 5 | - | - |
| 14 | 2 | 35 | 210 | 90 | 7,42 | 0,550 | 50 | 50 | 40 | 30 | 5 | z | 40 | 30 | 15 | 5 | z | - |
| 15 | 3 | 45 | 375 | 95 | 7,32 | 0,600 | 70 | 50 | 40 | 25 | 5 | 5 | 25 | 15 | 5 | 5 | - | - |
| 16 | 4 | 40 | 200 | 95 | 7,30 | 0,600 | 75 | 55 | 45 | 30 | 20 | 10 | 25 | 10 | 5 | 5 | z | z |
| 17 | 1 | 35 | 435 | 85 | 7,39 | 0,450 | 65 | 50 | 30 | 10 | 5 | - | 40 | 25 | 10 | z | - | - |
| 18 | 2 | 50 | 260 | 85 | 7,34 | 0,500 | 60 | 50 | 20 | 5 | z | - | 50 | 30 | 10 | z | - | - |
| 19 | 3 | 75 | 355 | 90 | 7,29 | 0,550 | 70 | 65 | 25 | 15 | 5 | - | 50 | 30 | 15 | z | - | - |
| 20 | 4 | 35 | 275 | 95 | 7,27 | 0,550 | 60 | 40 | 25 | 10 | 5 | - | 40 | 30 | 20 | 5 | z | - |
| 21 | 1 | 35 | 235 | 85 | 7,53 | 0,337 | 80 | 70 | 45 | 20 | 15 | 5 | 60 | 50 | 25 | 5 | z | z |
| 22 | 2 | 25 | 200 | 90 | 7,35 | 0,375 | 85 | 70 | 60 | 40 | 20 | z | 80 | 65 | 50 | 20 | - | - |
| 23 | 3 | 30 | 320 | 95 | 7,40 | 0,412 | 75 | 60 | 40 | 30 | 10 | z | 60 | 45 | 25 | 10 | 5 | - |
| 24 | 4 | 25 | 165 | 95 | 7,34 | 0,412 | 70 | 65 | 40 | 25 | 10 | z | 55 | 50 | 35 | 10 | 5 | - |
| 25 | 1 | 65 | 385 | 85 | 7,26 | 0,300 | 70 | 65 | 50 | 40 | 30 | 15 | 60 | 50 | 40 | 35 | 20 | - |
| 26 | 2 | 35 | 215 | 90 | 7,40 | 0,375 | 60 | 45 | 20 | 20 | 10 | z | 50 | 40 | 10 | 5 | 5 | - |
| 27 | 3 | 40 | 215 | 95 | 7,41 | 0,450 | 80 | 70 | 65 | 50 | 25 | 5 | 70 | 50 | 50 | 40 | 15 | z |
| 28 | 4 | 35 | 200 | 95 | 7,19 | 0,450 | 80 | 70 | 70 | 55 | 40 | 15 | 70 | 60 | 45 | 25 | 10 | - |
| 29 | 1 | 60 | 180 | 90 | 7,45 | 0,337 | 75 | 70 | 40 | 25 | 10 | 5 | 60 | 50 | 20 | z | - | - |
| 30 | 2 | 30 | 190 | 95 | 7,40 | 0,450 | 65 | 65 | 50 | 40 | 20 | 10 | 45 | 40 | 15 | z | - | - |
| 31 | 3 | 50 | 350 | 95 | 7,33 | 0,662 | 80 | 80 | 50 | 40 | 35 | 20 | 70 | 70 | 40 | 30 | 25 | 5 |
| 32 | 4 | 50 | 260 | 95 | 7,31 | 0,650 | 85 | 75 | 55 | 45 | 30 | 20 | 70 | 60 | 40 | 30 | 25 | 10 |

z = Zittern, keine Vorwärtsbewegung mehr

Tabelle 14

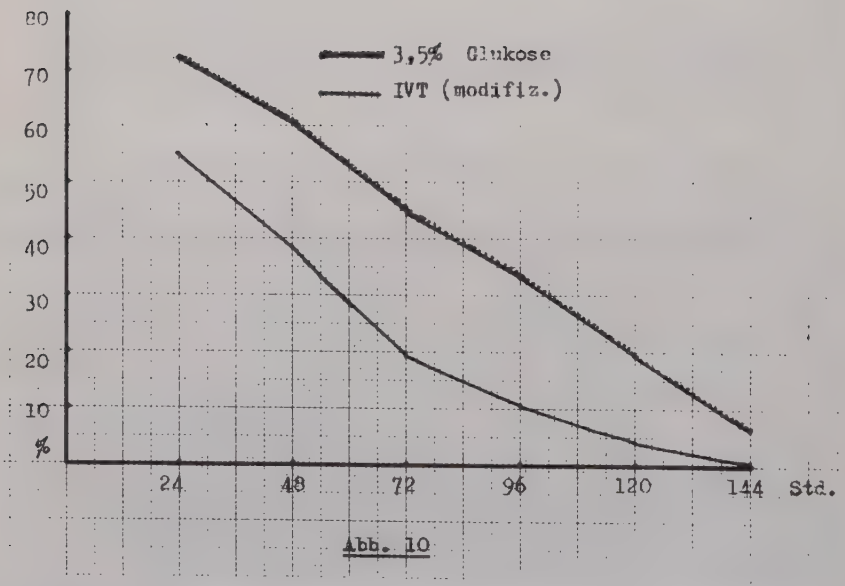
80
70
60
50
40
30
20
10
%
3,5% Glukose
IVT (modifiz.)
24
48
72
96
120
144
Std.

Abb. 10

In der Tabelle 15 sind die durchschnittlichen Beweglichkeitsprozentzahlen nach Ebern getrennt aufgeführt worden, die Abbildungen 11 und 12 stellen diese Werte in Kurvenform dar.

Verdünner 4 Beweglichkeitsprozentzahlen in Stunden nach Ebern

| Eber | Reaktivierungsverfahren | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | IVT | 51,8 | 36,2 | 16,2 | 7,5 | 3,1 | - |
| | 3,5% Glukose | 71,2 | 61,8 | 41,2 | 27,5 | 14,3 | 5,6 |
| 2 | IVT | 55 | 35,6 | 16,8 | 6,2 | 1,2 | - |
| | 3,5% Glukose | 67,5 | 56,8 | 41,8 | 31,2 | 13,1 | 3,7 |
| 3 | IVT | 56,2 | 38,7 | 21,8 | 14,3 | 6,8 | 1,2 |
| | 3,5% Glukose | 75,6 | 62,5 | 45 | 35 | 16,2 | 6,8 |
| 4 | IVT | 56,8 | 43,7 | 23,7 | 14,3 | 6,2 | 1,2 |
| | 3,5% Glukose | 75,6 | 61,8 | 50,6 | 40,6 | 23,1 | 10 |

Tabelle 15

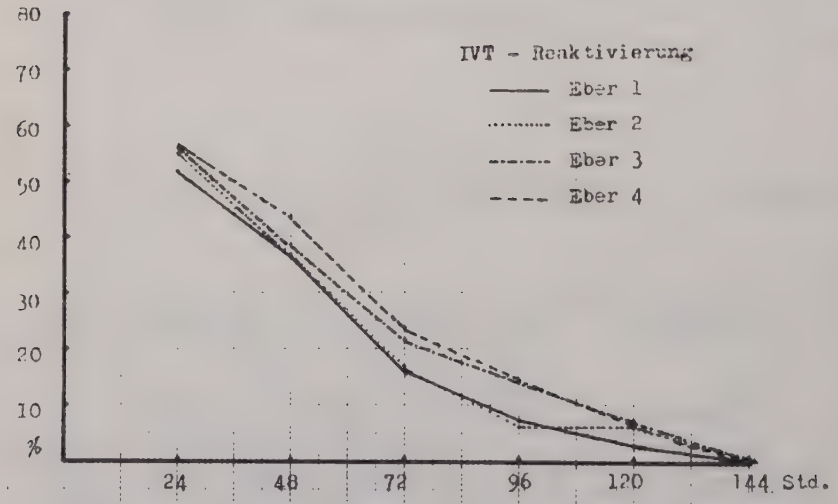
IVT - Reaktivierung
Eber 1
Eber 2
Eber 3
Eber 4
80
70
60
50
40
30
20
10
%
24
48
72
96
120
144 Std.

Abb. 11

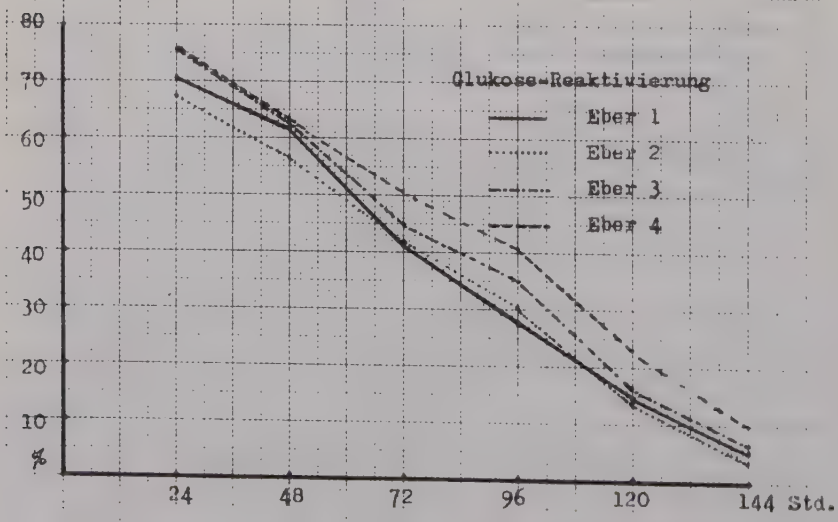
Glukose-Reaktivierung
Eber 1
Eber 2
Eber 3
Eber 4
80
70
60
50
40
30
20
10
%
24
48
72
96
120
144 Std.

Abb. 12

Besprechung der Ergebnisse im Verdünner 4

Die Konservierungsergebnisse der 32 spermareichen Ejakulatsphasen im Verdünner 4 machen eine Anhebung der Konservierungsergebnisse, verglichen mit denen in den Verdünnern 1 - 3, deutlich.
Diese Feststellung trifft auf sämtliche Eber in beiden Reaktivierungsverfahren zu. Waren in den anderen Verdünnern die Beweglichkeitsprozentzahlen von Eber 3 und 4 denen der Eber 1 und 2 deutlich überlegen, so kann man anhand der Ergebnisse im Verdünner 4 feststellen, daß eine Angleichung der Versuchsresultate in den beiden Eberpaaren erfolgt ist. Zwar waren die Beweglichkeitsprozentzahlen am 1. Untersuchungstag in der Glukosereaktivierung mit 75,6% bei den Ebern 3 un 4 am besten, jedoch waren diese Werte nur 4 bzw. 8 % besser als bei den Ebern 1 und 2. Der Abfall der Spermienbewegung war im Verdünner 4 bei allen Ebern auch langsamer und gleichmäßiger als dies bei den Verdünnern 1 - 3 festgestellt werden konnte.
Das Glukosereaktivierungsverfahren war auch in diesem Verdünner dem IVT - Reaktivierungsverfahren eindeutig überlegen.

## D. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Eberspermakonservierungsversuchen bei einer Lagerungstemperatur von + 1°C konnte festgestellt werden, daß eine langsame und kontinuierliche Temperaturabsenkung der Samenkonserven von Zimmer- auf Kühlschranktemperatur für die Aufrechterhaltung der Lebensvorgänge in den Eberspermien notwendig war.
Bei den 3 untersuchten Isoliermaterialien zeigte sich eine deutliche Überlegenheit des Isolierkissens 3 (Styropor) gegenüber den in ihrem Isolierungseffekt für die in dieser Arbeit gestellten Anforderungen weniger geeigneten Schaumstoffkissen. Die Temperaturanpassung der Samenkonserven von + 20°C auf + 1°C war im Kissen 3 mit 10 Stunden um mehr als 3 1/2 Stunden größer als im Kissen 2, und sogar 7 Stunden größer als im Kissen 1.
Mit zunehmender Verlängerung der Temperaturanpassungszeit stiegen die Überlebensraten der konservierten Eberspermien. Dies bestätigt die Angaben von HOFFMANN (1959), WILLEMS (1959), MILOWANOW und SOKOLOWSKAJA (1960), ROTHE (1962) u.a.

Bei Untersuchungen über die Eignung verschiedener Verdünnungsflüssigkeiten bei der Reaktivierung des konservierten Ebersamens konnten in allen 4 verwendeten Verdünnern mit einer 3,5%igen Glukoselösung weit größere Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien beobachtet werden als mit dem sulfanilamid- und eidotterfreien IVT - Verdünner.

Die nach dem Reaktivierungsprozeß festgestellten Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien lagen nach Verwendung einer 3,5%igen Glukoselösung um durchschnittlich 10% höher als bei der Reaktivierung mit dem modifizierten IVT - Verdünner. Im Verdünner 4 war der Unterschied in den Beweglichkeitsraten noch größer. Nach 24-stündiger Konservierungsdauer betrug die Differenz - Glukose zu IVT - mit 71,9 zu 55 % = 16,9% und nach 48 Stunden sogar 21% (60,7 zu 38,6%). Eine Aufstellung der Beweglichkeitsprozentsätze der Spermien in allen 4 Verdünnern, getrennt nach den beiden Reaktivierungsmethoden, macht dies in den Tabellen 16 und 17 deutlich.

Reaktivierung mit modifiziertem IVT - Verdünner
Beweglichkeitsprozentsätze der Spermien in Stunden

| | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Verdünner 1 | 20,4 | 5 | - | - | - | - |
| Verdünner 2 | 43,2 | 28,7 | 14,2 | 9,3 | 3,2 | 0,7 |
| Verdünner 3 | 32,1 | 17,3 | 11,9 | 2,9 | 0,9 | 0,1 |
| Verdünner 4 | 55 | 38,6 | 19,7 | 10,6 | 4,4 | 0,6 |

Tabelle 16

Reaktivierung mit 3,5%iger Glukoselösung

Beweglichkeitsprozentsätze der Spermien in Stunden

| | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Verdünner 1 | 32,1 | 13,8 | 2,5 | 0,4 | - | - |
| Verdünner 2 | 53,9 | 40 | 27,1 | 14,2 | 6,8 | 2,3 |
| Verdünner 3 | 42,0 | 41,8 | 19,1 | 8,1 | 2,9 | 0,9 |
| Verdünner 4 | 71,9 | 60,7 | 40,5 | 33,6 | 19,7 | 6,6 |

Tabelle 17

Bei einer vergleichenden Betrachtung der in den 4 Verdünnern erzielten Konservierungsergebnisse kann festgestellt werden, daß die mit Abstand besten Resultate im Verdünner 4 erzielt wurden.
Gemessen an den Ergebnissen mit der Glukose-Reaktivierung (Tabelle 17) war der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien im Verdünner 4 nach 24 Stunden 18% größer als im Verdünner 2, 30% größer als im Verdünner 3 und sogar 40% größer als im Verdünner 1. Auch nach 48-stündiger Konservierungszeit war die Überlegenheit des glycerin- und eidotterhaltigen Magermilchverdünners (Verdünner 4) mit 18 bzw. 20% gegenüber den Verdünnern 2 und 3 noch genau so deutlich. Die nächstbesten Konservierungsergebnisse wurden mit einem glycerinfreien 40% Eidotter enthaltenen Magermilchverdünner (Verdünner 2) erzielt.

Die im Verdünner 1 beobachteten prozentualen Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien konnten weder am 1. Auswertungstag, noch im weiteren Verlauf der Untersuchungen zufriedenstellen.
Ein eidotterhaltiger Magermilchverdünner erscheint nach den vorliegenden Versuchsergebnissen bei Ebersamenkonservierungen in tieferen Temperaturbereichen geeignet zu sein.
Diese Tatsache deckt sich mit den Angaben von WILLEMS (1959), WETTKE und HUHN (1962), SPREMBERG (1963 und 1964).
Nach SPREMBERG (1964), der bei einem Zusatz von Glycerin zu einem Milch-Dotter-Verdünner eine deutliche Motilitätsschädigung der Spermien feststellte, konnte nach vorliegenden Konservierungsergebnissen durch Zusatz von Glycerin zu einem $CO_2$ - gesättigten eidotterhaltigen Magermilchverdünner eine Anhebung der Beweglichkeitsraten der konservierten Eberspermien beobachtet werden. Durch einen Glycerinzusatz zum Verdünner konnte eine Verbesserung der Konservierungsergebnisse bei Ejakulaten der Eber erzielt werden, deren Samen sich in den glycerinfreien Verdünnern 1 - 3 als schlecht konservierbar gezeigt hatten.

Weitere Vergleiche der vorliegenden Konservierungsresultate mit entsprechenden Angaben in der Literatur sind nicht möglich, da andere Autoren nicht unter $CO_2$ - Bedingungen arbeiteten, sowie andere Methoden, Verdünner und Lagerungstemperaturen benutzten.

## E. ZUSAMMENFASSUNG

Bei Konservierungsversuchen mit 140 spermareichen Ejakulatsfraktionen bei den Kühlschranktemperaturen von + 1°C konnte festgestellt werden:

1. Bei einer Abkühlungszeit des konservierten Ebersamens von 10 Stunden konnten bessere Versuchsergebnisse erzielt werden, als nach 3 und 6 1/2 - stündiger Abkühlungszeit. Styropor erwies sich bei vergleichenden Untersuchungen als ein geeignetes Isoliermaterial für diese Konservierungsmethode.

2. Bei dem Reaktivierungsprozeß des konservierten Ebersamens zeigte sich eine 3,5%ige Glukoselösung einem modifiziertem IVT - Verdünner überlegen.

3. Ein eidotterhaltiger Magermilchverdünner scheint für die Ebersamenkonservierung bei Kühlschranktemperaturen besser geeignet zu sein als eidotterhaltige salinische Verdünner und Glukose-Verdünner.

4. Durch Glycerinzusätze zu einem eidotterhaltigen Magermilchverdünner konnte eine Anhebung des prozentualen Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien von 18 - 20 % gegenüber einem glycerinfreien Magermilchverdünner mit Eidotterzusatz beobachtet werden.

5. Zufriedenstellende Konservierungsergebnisse von 3 - 4 Tagen konnten bei Vergleich der Versuchsresultate in sämtlichen 4 Konservierungsmethoden nur im glycerin- und eidotterhaltigen Magermilchverdünner (Verdünner 4) erzielt werden.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALMQUIST, J.O. (1954) Diluters for bovine semen. V. A comparison of heatet milk and egg yolk-citrate as diluters for semen from bulls of high and low fertility. J.Dairy Sci. 37, 1308 - 1315

2. ALMQUIST, J.O.(1957) Pensylvania program makes selected matings possible using liquid semen. A.I.Digest 5, H 24

3. ALMQUIST, J.O.(1959) Efficient, low cost results using milk-glycerol diluents. A.I.Digest 7, H 8

4. ARCHIPOWETZ, A.J. (1960) Die Verwertung von mit Kohlendioxyd gesättigtem Sperma (russ.). Milchvieh- u. Fleischviehzucht (russ.). 5, Nr. 9, 49 - 52 Ref.Landw.Zbl.Abt. IV, 2049 (1961)

5. ARCHIPOWETZ, A.J. (1961) Fraktionierte Gewinnung und Konservierung des Eberspermas (russ.). Swinowodstwo 4, 28 - 31 zit. bei ROTHE, K. (1963) Arch.Exper.Vet.Med., 16, 957 - 1089

6. ARCHIPOWETZ, A.J. (1962) Die Konservierung des Eberspermas unter Zusatz von Ascorbin- und Salicylsäure (russ.). Swinowodstwo, 5, 34-35 zit. bei ROTHE, K. (1963) Arch. Exper.Vet.Med., 16, 957-1089

7. BADER, B. (1964) Versuche zur Tiefgefrier - konservierung von Ebersamen Vet.med.Diss. Hannover

8. BAIER, W. (1962) Erfahrungen in der künstlichen Besamung des Hausschweines einschließlich der Verwendung von Tiefkühlsamen (Zootec.Vet. 17, 94 - 99

9. BANE, A. (1959) Some results of studies on the semen of young boars and on artificial insemination in pigs. Ann.Zootech. 8, 15 - 20

10. BEN JOSEPH, A. u.F.DU MESNIL DU BUISSON (1961) Essai d'insemination artificielle porcin en Israel. IV. Intern.Congr.Anim.Reprod., Den Haag

11. BIALY, G. u. H.L.SELF (1959) The storage potential and citric acid content of fractionated ejaculates of the boar. J.Anim.Sci. 18, 374 - 382

12. BONADONNA, T. (1940) Manuale di tecnia della fecondazione artificiale degli animali.
Milesi, Milano
zit.bei HOF, H. (1956)
Die künstliche Besamung des Schweines im Schrifttum
Vet.med.Diss. Gießen

13. DU MESNIL DU BUISSON, F. (1957) Conservation du sperme de verrat sans dilution; conditions d'examen.
Ann.Zootech. 4, 391 - 399

14. DU MESNIL DU BUISSON, F. u. L.DAUZIER (1958) Maintien du pouvoir fécondant du sperme de verrat en présence de gaz carbonique.
Compt.rend.acad.sci. 247, 2472 - 2475

15. DU MESNIL DU BUISSON, F. u. L.DAUZIER (1959) Amélioration des techniques de conservation de la semence de verrat par dissolution âsaturation d'anhydride carbonique dans le milieu de conservation et conditions de leur utilisation practique.
Ann.Zootech. 8, 81 - 96

16. DU MESNIL DU BUISSON, F. u. R.JONDET (1961) Utilisation du $CO_2$ dans l'insémination porcine.
IV. Internat.Congr.Anim.Reprod., Den Haag

17. DZIUK, P.J.(1958) Dilution and storage of boar semen. J.Anim.Sci. 17, 548 - 553

18. EIBL, K., H.F. ZODER u. R.HAHN (1959 a) Samenkonservierung mittels Kohlensäure. Dtsch.tierärztl.Wschr. 66, 1 - 6

19. EIBL, K., H.F. ZODER u. R.HAHN (1959 b) Stand des $CO_2$ - Inaktivierungsverfahrens des Bullensamens. Dtsch.tierärztl.Wschr. 66, 301-304

20. EIBL, K. u. K.WETTKE (1964) A.I. of pigs using $CO_2$-inactivated boar semen. Vet.Rec. 76, 856

21. FEREDAN, T. u. E.SLOVESCU (1961) Beiträge zum Studium der Verdünnung und Konservierung von Ebersamen. Vortrag in Karlori Vary zit.nach ROTHE (Nr. 53)

22. GÖTZE, R. (1949) Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere. Verlag M.u.H.Schaper, Hannover

23. HAHN, R. (1963) Zur Konservierung des Ebersamens. Tierärztl.Umschau 18, 165-166

24. HANSEN, L.H. u. Fr.JACOBSEN (1958) Den artivicielle insemination i svineavlen. Aarsberetning 1958/Annual Report A/S Carl Fr.Mortensen, Kopenhagen zit.nach ROTHE, K. (1962)

25. HANSEN, L.H., JACOBSEN, Fr.Kj. u.N.O.RASBECH (1960)
Künstliche Besamung in der Schweinezucht.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 67, 397-401

26. HEIDRICH, H.J., D.ROHLOFF u. U.v.PUSCH (1964)
Beitrag zur Ebersperma-Konservierung der spermareichen Hauptphase in eidotterhaltigen Verdünnern.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 71,662-664

27. HESS, E.A., T.M. LUDWICK u. H.S. TEAGUE (1960)
Motility of boar spermatozoa as influenced by semen freezing procedures.
J.Anim.Sci. 19, 926-931

28. HOFFMANN, H. (1959)
Versuche zur Frostkonservierung des Ebersamens.
Vet.Diss.München

29. ITO, S,T.NIWA, A.KUDO u. A. MIZUHO (1948)
Studies on the artificial insemination in swine. II. Observations on the semen and its storage trial.
Bull.Zootech.Exper.Station 55, 17 - 56

30. KRZYSZKOWSKI, C. u. G.PAWLOW (1927)
Beiträge zur Biologie der Spermatozoen.
Zschr.Tierzüchtg.Züchtungsbiol. 10, 257

31. KVASNITZKI, A.W. (1959) Méthode fractionée d'insémination artificielle des truies. Ann.Zootech. 8, 43 - 58

32. LASLEY, J.F. u. R.BOGART (1944) Some factors affecting the resistance of ejaculated and epididymal spermatozoa of the boar to different enviromental conditions. J.Physiol. 141, 619-624

33. LIESS, J. u. D.GROVE (1963) Beitrag zur Inaktivierung von Ebersamen durch Begasung des unverdünnten Ejakulats mit Kohlendioxyd. Dtsch.tierärztl.Wschr. 70,433-437

34. MANN, T. (1954) The biochemistry of semen. London u. New York

35. MÄCKLE, N. (1961) Weitere Versuche zur Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners. Berliner Münchener tierärztl. Wschr. 74, 379

36. MÄCKLE, N. u. J.TILLACK (1960) Vergleichende Versuche mit 3 Spermaverdünnern. Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 73, 184 - 186

37. MELROSE, D.R. u. C.O'HAGAN (1959) Some obversations on the collection of boar semen and its use for artificial insemination. Ann.Zootech. 8, 69 - 79

38. MILOWANOW, V.K. (1934) Die künstliche Besamung der Haustiere. (russ.) Ref.in Anim.Breed.Abstr. 2, 403

39. MILOWANOW, V.K. (1957) Die Technik der künstlichen Besamung beim Schwein. Swinowodstwo, 2, 14 - 19

40. MILOWANOW, V.K., u.J.SOKOLOWSKAJA (1960) Die künstliche Besamung der landwirtschaftlichen Nutztiere. Die Presse der Sowjetunion, Sonderbeilage 35 zit.bei SPREMBERG, K. (1963)

41. NIWA, T., A.MIZUHO u. A. SOEJIMA (1959) Studies on the artificial insemination in swine. VI. Use of milk-powder diluent for the preservation of boar semen. Bull.Nat.Inst.Agric.Sci.Ser.G, 19, 39

42. NOLL, D. (1949) Studies on longevity of the sperm of the boar. Philipp.J.Anim.Ind. 10, 247 - 259

43. PAREDIS, F. (1959) A comparison between three diluents for boar semen. Ann.Zootech. 8, 111 - 112

44. PAREDIS, F. (1961) Untersuchungen über die Fruchtbarkeit und die künstliche Besamung bei Schweinen. Mitt.d.tierärztl.Hochschule d. Staatsuniversität Gent, 5.Jg., Nr. 1

45. POLGE, C. (1956) Artificial insemination in pigs. Vet.Rec. 68, 62 - 76

46. POLGE, C. (1959) Some experiments on the preservation of boar semen. Ann.Zootech. 8, 113 - 120

47. POLGE, C. (1949) SMITH, U. u. A.S.PARKES Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164, 666

48. PRACHOFF, R. (1958) Die Milch als Pufferlösung für Sperma bei künstlicher Besamung der landwirtschaftlichen Nutztiere. Zuchthyg. 2, 144 - 150

49. PUSCH v., U. (1965) Beitrag zur Eberspermakonservierung. Vergleichende Untersuchungen über die Konservierung der spermareichen Hauptphasen in eidotterhaltigen und eidotterfreien IVT- und Magermilchverdünnern mit Hilfe der $CO_2$-Inaktivierung. Vet.med.Diss.F.U.Berlin

50. REDENZ, E. (1924) Versuch einer biologischen Morphologie des Nebenhodens. Arch.Mikrosk.Anat.Entwicklg.Mechan. 103, 593

51. ROHLOFF, D. (1964) Versuche zur Konservierung von Ebersperma mit Hilfe der $CO_2$-Inaktivierung unter Verwendung verschiedener Verdünner. Vet.med.Diss.F.U.Berlin

52. ROHLOFF, D. u.D.KOHRING (unveröffentlicht)

53. ROTHE, K. (1962) Beitrag zur Verbesserung der Konservierung und der Transportmöglichkeiten des Schweinespermas. Zuchthyg. 6, S. 305-314

54. ROY, A. (1955) Storage of boar and stallion spermatozoa in glycine-egg-yolk medium. Vet.Rec. 67, 330 - 331

55. SALISBURY, G.W. u. N.L. VAN DEMARK (1957) Carbon dioxyde as a reversible inhibitor of spermatozoen metabolism Nature 180, 989 - 990

56. SETTERGREN,J. (1958) Experiments on the deep freezing of boar semen at -79°C. VIII. Nordiska Veteriärmötet,Helsingfors Sekt.D, rapport 26

57. SMIDT, D. (1964) Untersuchungen zur künstlichen Besamung beim Schwein. Dtsch.tierärztl.Wschr. 71, 369-375 u. 408 - 410

58. SPREMBERG, K. (1963) $CO_2$-Konservierung von Ebersperma. Vet.med.Diss.HU Berlin

59. SPREMBERG, K. (1964) Laborversuche über die Eignung von Milchverdünnern zur Konservierung von Ebersperma. Fortpfl.d.Haustiere Bd. 1, 9 - 22

60. THACKER,D.L. u.J.O.ALMQUIST (1951) Milk and milk-products as diluters for bovine semen. J.Anim.Sci. 10, 1082

61. THACKER, D.L., R.J.FLIPSE u. J.O.ALMQUIST (1954) Diluters for bovine semen. II. Effect of milk proteins upon spermatozoan livability. J.Dairy Sci. 37, 220 - 227

62. TILLACK, J. (1961) Vergleichende Untersuchungen über die Eignung der Spermaverdünner Spermasol-N und Magermilch-Glycerin zur Konservierung von Bullensamen bei Kühlschranktemperatur. Vet.med.Diss. F.U. Berlin

63. VAN DEMARK, N.L. u.L.R.COUTURIER (1956) A dialysis technique for semen physiology studies. J.Anim.Sci. 15, 1212

64. VAN DEMARK, N.L. u.L.R.COUTURIER (1958) Flow dialysis as a means of preserving bovine semen at room temperature. J.Dairy Sci. 41, 530 - 536

65. VAN DEMARK,N.L. u.U.D.SHARMA (1957) Preliminary fertility results from the preservation of bovine semen at room temperature. J.Dairy, Sci. 40, 438 - 439

66. WALTON, A. (1933) The technique of artificial insemination. London 1933

67. WETTKE, K. u. D.ROHLOFF (1964) Versuche zur Konservierung von Ebersperma durch $CO_2$-Inaktivierung. Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 77, 8 - 11

68. WETTKE, K. u. J.E.HUHN (1962) Beitrag zur Spermagewinnung beim Eber und vergleichende Konservierungsmethoden bei Temperaturen von + 4°C und+12°C unter besonderer Berücksichtigung eines Magermilchverdünners. Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 75, 211 - 214

69. WILLEMS, C.M. (1959) Kunstmatige inseminatie bij varkens. Tschr.diergeneesk. 84, 208 - 234

Für die Übertragung der Aufgabe und die mir bei der Arbeit gewährte Hilfe bin ich Herrn Professor Dr. H. J. H e i d r i c h sehr dankbar.

Herrn Dr. D. R o h l o f f gilt mein besonderer Dank für die gegebenen Anregungen und Unterstützungen bei der Durchführung der Versuche sowie für die freundliche Beratung bei der Abfassung der Dissertation.

Lebenslauf

Am 27. Februar 1939 wurde ich, Dirk K o h r i n g, als Sohn des Kaufmanns Bernhard Kohring und seiner Ehefrau Hertha Kohring, geb. Exner in Berlin geboren.

In Gieba-Rundsdorf, Kreis Altenburg/Thüringen wurde ich 1945 eingeschult. Nach Berlin zurückgekehrt besuchte ich ab 1948 die 6. Grundschule im Bezirk Tiergarten. 1951 wechselte ich auf die Menzel-Schule (1.O.W.Z.) über, an der ich im Februar 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1958 wurde ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert und legte im Sommer 1961 die Vorprüfung ab. 1964 bestand ich an derselben Fakultät das Staatsexamen und erhielt nach Ableistung der halbjährigen Veterinärassistentenzeit am 1. November 1964 die Approbation als Tierarzt.